

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents
United States Patent and Trademark
Office
Box PCT
Washington, D.C.20231
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing: 20 July 2000 (20.07.00)	
International application No.: PCT/JP99/00117	Applicant's or agent's file reference: PH-593-PCT
International filing date: 14 January 1999 (14.01.99)	Priority date:
Applicant: AONUMA, Takemi	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International preliminary Examining Authority on:
28 May 1999 (28.05.99)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was

☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

<p>The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland</p> <p>Facsimile No.: (41-22) 740.14.35</p>	<p>Authorized officer:</p> <p>J. Zahra</p> <p>Telephone No.: (41-22) 338.83.38</p>
--	--

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-155193

(43) 公開日 平成7年(1995)6月20日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示 所
C 1 2 P 19/26		7432-4B		
// (C 1 2 P 19/26				
C 1 2 R 1:07)				

審査請求 未請求 請求項の数 5 O L (全 4 頁)

(21) 出願番号 特願平5-306581

(22) 出願日 平成5年(1993)12月7日

(71) 出願人 000003160

東洋紡績株式会社

大阪府大阪市北区堂島浜2丁目2番8号

(72) 発明者 柴谷 滋郎

滋賀県大津市堅田二丁目1番1号 東洋紡績株式会社総合研究所内

(72) 発明者 宮下 正人

滋賀県大津市堅田二丁目1番1号 東洋紡績株式会社総合研究所内

(72) 発明者 前川 宜彦

滋賀県大津市堅田二丁目1番1号 東洋紡績株式会社総合研究所内

(54) 【発明の名称】 微生物由来キトサンオリゴ糖の製造方法

(57) 【要約】

【目的】 キトサン産生微生物の菌糸体から簡略化された工程で微生物由来のキトサンオリゴ糖、特に5量体以上の高重合度のキトサンオリゴ糖を効率的に製造する。

【構成】 アブシディア・コエルレア (*Absidia coerulea*) IF05301 株またはムコル・ツベルクリスポルス (*Mucor tuberculisporus*) IF09256株などのキトサン産生微生物の菌糸体細胞壁を、バチルス (*Bacillus*) sp. PJ-7S由来キトサナーゼ-RDまたはトリコデルマ・ヴィリデ (*Trichoderma viride*) 由来セルラーゼ・オノズカR-10等のキトサンオリゴ糖を生成する酵素で処理することを特徴とする微生物由来キトサンオリゴ糖の製造方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 キトサン産生微生物の菌糸体細胞壁を分解し、キトサンオリゴ糖を生成する酵素により、キトサン産生微生物の菌糸体を処理することを特徴とする微生物由来キトサンオリゴ糖の製造方法。

【請求項2】 キトサン産生微生物がアブシディア・コエルレア (*Absidia coerulea*) またはムコル・ツベルクリスボルス (*Mucor tuberculisporus*) であることを特徴とする請求項1記載の微生物由来キトサンオリゴ糖の製造方法。

【請求項3】 キトサン産生微生物の菌糸体細胞壁を分解し、キトサンオリゴ糖を生成する酵素が、キトサナーゼまたはセルラーゼであることを特徴とする請求項1記載の微生物由来キトサンオリゴ糖の製造方法。

【請求項4】 キトサナーゼがバチルス属由来キトサナーゼであることを特徴とする請求項1記載の微生物由来キトサンオリゴ糖の製造方法。

【請求項5】 セルラーゼがトリコデルマ属由来セルラーゼであることを特徴とする請求項1記載の微生物由来キトサンオリゴ糖の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明はキトサンオリゴ糖の製造方法に関し、詳しくはキトサン産生微生物の菌糸体を酵素処理することによるキトサンオリゴ糖の製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 近年、キトサンは、地球上に豊富に存在する次世代のバイオマスとして注目されており、その生体適合性や生分解性を活かした種々の用途開発が研究されている。キトサンは高分子量であるが故に溶液とした場合、高粘度のために取扱いが困難であり、高濃度の溶液の調製が不可能である。また、溶液を中性ないしアルカリ性にするると不溶化する。これらの特性がキトサンの用途を制限している。そこで、キトサンの用途を広げるものとして、高分子量のキトサンを加水分解して得られる易水溶性のキトサンオリゴ糖の利用が期待されている。特に5量体以上の高重合度のキトサンオリゴ糖に抗菌性、抗腫瘍性、植物エリキター活性等の種々の生理活性が見出されており、付加価値が高まっている。

【0003】 従来からキトサンオリゴ糖の製造法として、カニやエビ等の甲殻類から抽出したキチンを化学的に脱アセチル化することにより得られるキトサンを塩酸等の酸によって加水分解して低分子化する方法 (J. Am. Chem. Soc., 79, 5046~5049, (1957)) が知られている。しかしながら、この方法は酸を用いることによる安全性の問題や後処理の煩雑さに難点がある。また甲殻類から得られたキトサンをキトサナーゼ等のキトサン分解酵素で加水分解する方法が報告されている (特公平3-13878 号公報) が、この方法では生理活性が期待される5

量体以上の高重合度のキトサンオリゴ糖が高収率で得られていない。

【0004】 一方、微生物の中には接合菌類のように菌糸体細胞壁中にキトサンを含むものがあることが報告されている (Ann. Rev. Microbiol., 22, 87-108, (1968))。微生物由来のキトサンオリゴ糖の製造法として、キトサン産生微生物の菌糸体をアルカリで加熱処理した後に酢酸等の酸で抽出したキトサンを酵素によって加水分解して低分子化する方法が報告されている (特開平2-215393号公報)。しかしながら、微生物から抽出したキトサンを用いる場合、単位培養液当たりのキトサン生産量が低いために甲殻類から製造したキトサンを用いる場合に比較して価格が非常に高くなるという欠点がある。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】 本発明の目的は、キトサン産生微生物の菌糸体から簡略化された工程で微生物由来のキトサンオリゴ糖、特に5量体以上の高重合度のキトサンオリゴ糖を効率的に製造する方法を提供することにある。

【0006】

【課題を解決するための手段】 本発明者らは、キトサナーゼ等の細胞壁溶解酵素が微生物の細胞壁を分解することに着目し、キトサン産生微生物の菌糸体を酵素処理することにより高重合度のキトサンオリゴ糖を製造し得ることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0007】 すなわち、本発明はキトサン産生微生物の菌糸体細胞壁を分解し、キトサンオリゴ糖を生成する酵素により、キトサン産生微生物の菌糸体を処理することを特徴とするキトサンオリゴ糖の製造方法である。

【0008】 本発明に用いられる微生物としては、キトサンを産生しうる微生物であればいずれも用いることができる。例えばアブシディア (*Absidia*) 属、アクチノムコル (*Actinomucor*) 属、コアネフォラ (*Choanephora*) 属、クニングハメラ (*Cunninghamella*) 属、モルティエレラ (*Mortierella*) 属、ムコル (*Mucor*) 属、フィコマイセス (*Phycomyces*) 属、リゾプス (*Rhizopus*) 属等の接合菌類が挙げられる。具体例としては、アブシディア・コエルレア (*Absidia coerulea*) IF05301 株、ムコル・ツベルクリスボルス (*Mucor tuberculisporus*) IF09256株などが例示される。これらの微生物は、財団法人発酵研究所 (IFO) から入手することができる。

【0009】 本発明に使用する酵素は、上記キトサン産生微生物の菌糸体細胞壁を分解し、キトサンオリゴ糖を生成する酵素であればいずれも用いることができる。例えば、バチルス (*Bacillus*) 属、ストレプトマイセス (*Streptomyces*) 属、ペニシリウム (*Penicillium*) 属等に由来するキトサナーゼ、アスヘルギルス (*Aspergillus*) 属、トリコデルマ (*Torichoderma*) 属等に由来するセルラーゼが挙げられる。さらに具体的にはバチルス (*Bacillus*) s.p. PI-7S由来キトサナーゼ-RD (ヒアス製)、トリコデル

マ・ヴィリデ(*Trichoderma viride*)由来セルラーゼ・オノズカR-10(ヤクルト製)が挙げられる。これらの酵素はまず、例えば0.1M酢酸緩衝液(pH5.5)に約0.1~5U/ml添加し酵素製剤とする。酵素製剤のpHは、4.0~7.0であることが好ましい。

【0010】酵素活性は以下の方法により測定する。pH6.0の酢酸緩衝液に溶解した1%キトサン溶液と酵素液を含む反応液を37℃で10分間反応させる。反応液を約100℃で5分間加熱処理して酵素処理を終了した後、シャーレス(Schales)変法(Agric. Biol. Chem., 35, 1154-1156(1971))によりキトサナーゼ活性を測定する。1単位は、pH6.0、37℃において1分間に可溶性キトサンから1μモルのグルコサミン相当の還元糖を遊離する酵素量である。

【0011】工程1：菌糸体の調製

本発明に用いるキトサン産生微生物の菌糸体は、斜面培地等で継代培養した微生物をキトサン生産用液体培地で培養し、増殖することにより得られる。キトサン生産用液体培地としては、例えば酵母エキス0.1~2.5%、ポリペプトン0.5~5%、グルコース1~10%、硫酸アンモニウム0.5~1%、リン酸2水素カリウム0.1~1%、塩化ナトリウム0.1~1%、硫酸マグネシウム(7水和物)0.05~0.1%および塩化カルシウム(2水和物)0.01~0.1%を含むpH4.5の液体培地が例示される。培養条件としては、キトサン生産用液体培地で約25℃にて振とう培養する。培養期間は、4~5日間が好ましい。孢子濃度は $10^6 \sim 10^7$ 個/mlが好ましい。

工程2：菌糸体の破碎

培養された菌糸体は、例えば酢酸緩衝液等の水溶液中に浸漬してホモジナイザー等によって破碎した後、酵素処理に供する。

工程3：酵素処理

例えば酢酸緩衝液等の水溶液中に、上記酵素を添加した酵素製剤中に破碎した菌糸体を浸漬して振とうし、例えば、30~60℃にて1時間以上の酵素処理を行うことにより、反応液中にキトサンオリゴ糖を生成する。酵素処理は穏やかに振とうして行う。

工程4：反応終了

一般に約100℃で約5分間加熱処理して酵素処理を終了する。

工程5：精製

生成されたキトサンオリゴ糖は、イオンクロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィー等を用いることにより重合度別に分離することができる。

【0012】

【実施例】以下に実施例を挙げて本発明を詳細に説明する。

実施例1

ホテト・デキストロース寒天(日本製菓製)斜面培地上で25℃にて継代培養したアブシディア・コエルレア(*Ab-*

idia coerulea) IF05301株の孢子を滅菌水に懸濁した。孢子懸濁液を酵母エキス0.1%、ポリペプトン1%、グルコース2%、硫酸アンモニウム0.5%、リン酸2水素カリウム0.1%、塩化ナトリウム0.1%、硫酸マグネシウム(7水和物)0.05%および塩化カルシウム(2水和物)0.01%を含むpH4.5の液体培地100mlに、 $10^6 \sim 10^7$ 個/mlの孢子濃度となるように接種し、回転速度120rpm、25℃にて攪拌し、4日間培養した。生長した菌糸体を吸引濾過して集め、洗浄後、酵素処理に供した。

【0013】得られた菌糸体4gを0.1M酢酸緩衝液(pH5.5)に浸漬し、ホモジナイザーで破碎した。緩衝液を除去した後、破碎した菌糸体を、0.1M酢酸緩衝液(pH5.5)に0.1U/mlの濃度で添加したバチルス(*Bacillus*) sp. PI-7S由来キトサナーゼ-RD(ピラス製)の酵素製剤120ml中に浸漬し、37℃にて1時間以上穏やかに振とうして菌糸体の酵素処理を行った。酵素処理後、反応液を100℃で5分間加熱処理して反応を停止させた後、薄層クロマトグラフィー(TLC)により、酵素処理反応液中の酵素分解物を分析した。シリカゲルのTLCプレート(メルク社製Kieselgel 60F)に酵素処理反応液およびカニ殻由来キトサン分解物標準溶液を塗布し、1-ブタノール-酢酸-水=2:1:2で展開し、ニンヒドリン溶液で発色し、スポットの検出を行った。その結果、カニ殻由来キトサンオリゴ糖のスポットと一致するスポットが酵素処理反応液に認められた。図1はその結果を示す。

【0014】次に、全反応液のTLCを行い、キトサンオリゴ糖6量体に相当する画分の薄層を回収した。回収した薄層画分を0.1M酢酸中に懸濁し、不溶物を濾過して除去した後、溶出液を凍結乾燥することにより、6量体を主成分とする高重合度キトサンオリゴ糖画分118mgが得られた。

【0015】実施例2

実施例1と同様に、ムコル・ツベルクリスポルス(*Mucor tuberculisporus*) IF09256株を培養して得られた菌糸体4gを、0.1M酢酸緩衝液(pH5.5)に0.1U/mlの濃度で添加したトリコデルマ・ヴィリデ(*Trichoderma viride*)由来セルラーゼ・オノズカR-10(ヤクルト製)の酵素製剤120ml中で処理した。以後、実施例1と同様の操作を行った結果、酵素処理反応液のTLCにカニ殻由来キトサンオリゴ糖のスポットと一致するスポットが認められた。次に、全反応液のTLCを行った結果、高重合度キトサンオリゴ糖画分39mgが得られた。

【0016】比較例1

実施例1と同様の方法でアブシディア・コエルレア(*Ab- idia coerulea*) IF05301株を培養し、得られた菌糸体4gに2%水酸化ナトリウム水溶液300mlを加えて、オートクレーブ中で121℃にて1時間加熱処理した。得られたアルカリ不溶物質をガラスフィルターで集め、精製水で洗液が中性になるまで洗浄した。このアルカリ不溶物質710mgを2%酢酸水溶液300mlに浸漬し、ホモジナイザーで

破碎した後、37℃にて30分間攪拌した。攪拌後、遠心分離して、上澄液と沈殿に分離した。沈殿2回分の上澄液をガラスフィルターで濾過して不溶物を除去した。この酢酸抽出液に20%水酸化ナトリウム水溶液を添加して抽出液をpH8.5～9.0に調整し、キトサンを析出させた。析出したキトサンの水洗と遠心分離を計3回行った後、真空乾燥した。菌糸体から得られたキトサンの総量は204mgであった。上記方法で得られたアブシディア・コエルレアIF05301株由来のキトサン204mgを0.1M酢酸緩衝液に溶解して調製した1%キトサン溶液(pH5.5)に0.1U/mlのパチルスsp. PI-7S由来のキトサナーゼを加えて、37℃にて酵素反応を1時間以上行った。反応液を100℃で5分間加熱処理して反応を停止させた後、実施例1と同様の操作でTLCを行った。その結果、カニ殻由来キトサンオリゴ糖のスポットと一致するスポットが酵素反応

*液に認められた。次に全反応液のTLCを行った結果、6量体を主成分とする高重合度キトサンオリゴ糖画分41mgが得られた。

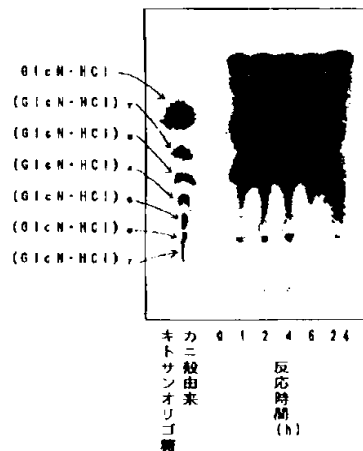
【0017】

【発明の効果】本発明によれば、キトサン産生微生物の菌糸体を酵素処理することにより、高重合度のキトサンオリゴ糖を得ることができる。本発明は、従来のキトサンオリゴ糖の製造法のようにキトサンを抽出することなく、より簡略化された工程でキトサンオリゴ糖を得ることができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】アブシディア・コエルレアIF05301株の菌糸体をパチルスsp. PI-7S由来キトサナーゼで酵素処理して得られた反応液をTLCで分析した結果を示す。

【図1】





PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **07155193 A**(43) Date of publication of application: **20.06.95**

(51) Int. Cl.

C12P 19/26
/(C12P 19/26 , C12R 1:07)(21) Application number: **05306581**(22) Date of filing: **07.12.93**(71) Applicant: **TOYOBO CO LTD**(72) Inventor: **SHIBATANI SHIGEO**
MIYASHITA MASATO
MAEKAWA YOSHIHIKO(54) **PRODUCTION OF CHITOSAN**
OLIGOSACCHARIDE DERIVED FROM
MICROORGANISM

(57) Abstract:

PURPOSE: To efficiently produce a chitosan oligosaccharide derived from a microorganism, especially the chitosan oligosaccharide having a high degree of polymerization of pentamer or a high polymer from a hypha of a microorganism capable of producing chitosan according to a simplified process.

CONSTITUTION: The characteristic of this method for producing a chitosan oligosaccharide derived from a microorganism comprises treating a hyphal cell wall of a microorganism capable of producing chitosan such as

Absidia coerulea IFO5301 strain or *Mucor tuberculisporus* IFO9256 strain with an enzyme capable of producing the chitosan oligosaccharide such as Chitosanase RD(R) derived from *Bacillus* sp. PI-7S or Cellulase onozuka R-10(R) derived from *Trichoderma viride*.

COPYRIGHT: (C)1995,JPO



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類6 C12N 1/20, C05F 11/08, A23L 1/20, A23K 1/16, A23L 1/015, 3/3571</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO00/42169</p> <p>(43) 国際公開日 2000年7月20日(20.07.00)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP99/00117</p> <p>(22) 国際出願日 1999年1月14日(14.01.99)</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) ゴールド興産株式会社(GOLD KOSAN CO., LTD.)(JP/JP) 〒989-6116 宮城県古川市李埴字東田251 Miyagi, (JP)</p> <p>(71) 出願人 ; および</p> <p>(72) 発明者 青沼武三(AONUMA, Takemi)(JP/JP) 〒989-6113 宮城県古川市箕口沼実倉35-1 Miyagi, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 平木祐輔, 外(HIRAKI, Yusuke et al.) 〒105-0001 東京都港区虎ノ門一丁目17番1号 虎ノ門5森ビル3F Tokyo, (JP)</p>		<p>(81) 指定国 AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54)Title: NOVEL MICROORGANISM AND USE THEREOF</p> <p>(54)発明の名称 新種の微生物およびその利用法</p> <p>(57) Abstract A microorganism belonging to the genus <i>Bacillus</i> characterized by being capable of reducing nitrates and containing chitin and/or chitosan in cell wall. This microorganism is usable in improving soil, processing organic wastes via fermentation, fermenting soybean and relieving a bitter taste. It is also usable as an additive for feeds or foods. Moreover, the microorganism has an antibacterial effect.</p>		

(57)要約

硝酸塩を還元することができ、細胞壁にキチンおよび／またはキトサンを含むことを特徴とする、バチルス属の微生物が提供される。本発明の微生物は、土壌の改良、有機性廃棄物の発酵処理、大豆の発酵、苦味の低減化のために使用することができる。また、本発明の微生物は、飼料添加物、食品添加物としても使用することができる。さらに、本発明の微生物は抗菌作用も有する。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE アラブ首長国連邦	DM ドミニカ	KZ カザフスタン	RU ロシア
AG アンティグア・バーブーダ	DZ アルジェリア	LC セントルシア	SD スーダン
AL アルバニア	EE エストニア	LJ リヒテンシュタイン	SE スウェーデン
AM アルメニア	ES スペイン	LK スリ・ランカ	SG シンガポール
AT オーストリア	FI フィンランド	LR リベリア	SI スロヴェニア
AU オーストラリア	FR フランス	LS レソト	SK スロヴァキア
AZ アゼルバイジャン	GA ガボン	LT リトアニア	SL シェラ・レオネ
BA ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB 英国	LU ルクセンブルグ	SN セネガル
BB バルバドス	GD グレナダ	LV ラトヴィア	SZ スワジランド
BE ベルギー	GE グルジア	MA モロッコ	TD チャード
BF ブルキナ・ファソ	GH ガーナ	MC モナコ	TG トーゴ
BG ブルガリア	GM ガンビア	MD モルドヴァ	TJ タジキスタン
BJ ベナン	GN ギニア	MG マダガスカル	TM トルクメニスタン
BR ブラジル	GR ギリシャ	MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR トルコ
BY ベラルーシ	GW ギニア・ビサオ	共和国	TT トリニダード・トバゴ
CA カナダ	HR クロアチア	ML マリ	TZ タンザニア
CF 中央アフリカ	HU ハンガリー	MN モンゴル	UA ウクライナ
CG コンゴ	ID インドネシア	MR モーリタニア	UG ウガンダ
CH スイス	IE アイルランド	MW マラウイ	US 米国
CI コートジボアール	IL イスラエル	MX メキシコ	UZ ウズベキスタン
CM カメルーン	IN インド	MZ モザンビーク	VN ヲトナム
CN 中国	IS アイスランド	NE ニジェール	YU ユーゴスラヴィア
CR コスタ・リカ	IT イタリア	NL オランダ	ZA 南アフリカ共和国
CU キューバ	JP 日本	NO ノールウェー	ZW ジンバブエ
CY キプロス	KE ケニア	NZ ニュージーランド	
CZ チェッコ	KG キルギスタン	PL ポーランド	
DE ドイツ	KP 北朝鮮	PT ポルトガル	
DK デンマーク	KR 韓国	RO ルーマニア	

明 細 書

新種の微生物およびその利用法

技術分野

本発明は、新種の微生物およびその利用法、より詳細には、バチルス属に属する新種の微生物およびその利用法に関する。

背景技術

人類は、これまで、種々の微生物を利用してきた。例えば、微生物のはたらきを利用して、酒類、みそ、しょうゆなどの発酵調味料、チーズ、ヨーグルトなどの発酵乳製品、パンなど様々な食品を製造している。この他、医薬および農薬の製造、アルコール、メタンなどのエネルギー資源の生産、金属の精錬、廃棄物処理、廃水処理などにも、微生物は利用されている。

微生物をはじめとする生物の機能を産業に利用する技術はバイオテクノロジーと呼ばれているが、この技術は今日目覚ましい発展を遂げている。新たな有用微生物の発見は、バイオテクノロジーの進歩に貢献する。

従って、本発明は、新規な有用微生物を提供することを目的とする。

また、本発明は、その微生物の利用法を提供することも目的とする。

発明の開示

本発明者らは、土壌からコーヒー臭のある新種の微生物を分離して、本発明を完成させるに至った。すなわち、本発明は、硝酸塩を還元することができ、細胞壁にキチンおよび／またはキトサンを含むことを特徴とする、バチルス属の微生物を提供する。本発明の微生物は、コーヒー臭を有しうる。本発明の微生物は、バチルス・サブチルス (*Bacillus subtilis*) に属するものであるとよく、その一例として、バチルス・サブチルス・タケミ (*Bacillus subtilis takemi*: F E R M B P - 6 5 8 9) を挙げることができる。

また、本発明は、上記の微生物を用いて土壌を改良する方法および上記の微生物

物を含む土壌を改良するための組成物を提供する。

さらに、本発明は、上記の微生物を用いて有機性廃棄物を発酵処理する方法および上記の微生物を含む有機性廃棄物を発酵処理するための組成物を提供する。

さらにまた、本発明は、上記の微生物を用いて大豆を発酵させる方法および上記の微生物を用いて発酵させた大豆を提供する。

本発明は、また、上記の微生物を飼料添加物として使用する方法および上記の微生物を含む飼料添加物を提供する。

本発明は、上記の微生物を苦味の低減化のために使用する方法および上記の微生物を含む苦味の低減化のための組成物を提供する。

本発明は、上記の微生物を食品添加物として使用する方法および上記の微生物を含む食品添加物を提供する。

本発明は、上記の微生物を用いて、細菌の増殖を抑制する方法および上記の微生物を含む抗菌性組成物を提供する。本発明の微生物のより増殖を抑制することができる細菌としては、ブドウ球菌、病原性大腸菌 O 1 5 7、O 1 4 7、白癬菌、ミクロコッカス科の苔類などを挙げることができる。

本発明の微生物は、硝酸塩を還元することができ、細胞壁にキチンおよび／またはキトサンを含むことを特徴とする、バチルス属の微生物である。また、コーヒー臭を有することもある。その一例として、バチルス・サブチルス・タケミ (*Bacillus subtilis takemi*: F E R M B P - 6 5 8 9) を挙げることができる。この微生物は、シベリアにて採取した土壌から以下のようにして分離された。

シベリア土壌50mgに滅菌蒸留水 500 μ l を加えて30分振とうし、懸濁液（液は褐色を呈する）とした。これを原液とし、10倍希釈シリーズにより 10^{-2} ～ 10^{-7} 希釈液を作製した。P D A Y C 培地 (Potato Dextrose Agar medium containing Yeast Extract and Casion) 上へ希釈液 100 μ l を播種し、コンラージ棒で一様に展開した。20°C、All day Light 条件下で静置培養を行った。その結果、 10^{-2} ～ 10^{-4} 希釈液で白色のコロニー形成が認められ、これは顕微鏡観察の結果糸状菌ではなかった。またコロニーは白色のみであり、単一種と推定される。 10^{-4} 以下の希釈液からはコロニーの形成は一切認められなかった。

分離された菌の性状は以下の通りである。

表 1 形態的性質

観察項目	観察結果
細胞の形及び大きさ	
肉汁寒天培地	・ 30℃、一夜培養で1.2～1.3 μm ×2.5～3.3 μm の直状桿菌である
肉汁液体培地	・ 30℃、一夜培養で0.9～1.2 μm ×4.6～7.2 μm の直状桿菌である
多形性の有無	・ 多形性を認めず
運動性	・ 周鞭毛* による運動性を認める
孢子	・ 楕円形で垂端立性の孢子の形成を認める ・ 孢子嚢は膨出を認めず ・ 孢子の大きさは肉汁寒天培地にて30℃、5日間培養で0.9～1.1 μm ×2.0～2.3 μm である。

表 2 各培地における培養的性質

培養	生育状態
肉汁寒天平板	・ 集落は粗面、周縁は波状から裂片状で光沢は認められない ・ 特徴的集落色素、拡散性色素の生成は認められない
肉汁液体	・ 培地の上部に生育し表面皮膜の形成も認められるが、沈殿は認められない
肉汁ゼラチン穿刺	・ 培地の上部に生育が認められ、液化が認められる
リトマス・ミルク	・ 培地上部の生育及び培地全体に液化が認められるが、凝固は認められない ・ 酸の生成は認められない

表 3 生理学的性質 その 1 *¹

試験項目	試験結果
脱窒反応	—
メチルレッド試験	+
インドールの生成	—
硫化水素の生成	
TSI 寒天	—
酢酸鉛液体培地* ²	+
クエン酸塩の利用	
Koser の培地	—
Christensen の培地	+
無機窒素源の利用	
硝酸塩	+
アンモニウム塩	+
色素の生成	—
ウレアーゼ	+
オキシダーゼ	—
生育の範囲* ³	
pH	4.5~8.5 (5.5~8.0で良好)
温度	12~51℃ (25~45℃で良好)
O/F (Hugh-Leifson)	○

*1 試験用培地は、長谷川武治編著：“微生物の分類と同定（下）”（1985）学会出版センターを参考にした。

*2 ただし、酢酸鉛を加えずに酢酸鉛試験紙を懸垂して試験した。

*3 肉汁ブロスを用いて試験した。なお、pHは0.5、温度は1℃刻みに試験した。

表 4 生理学的性質 その 2

試験項目	試験結果
酸の生成 ^{*1}	
L-アラビノース	+
D-キシロース	+
D-グルコース	+
D-マンノース	+
D-フラクトース	+
D-ガラクトース	+
マルトース	+
シュクロース	+
ラクトース	+
トレハロース	+
D-ソルビトール	+
D-マンニトール	+
イノシトール	+
グリセリン	+
デンプン	+
ガスの生成 ^{*2}	
L-アラビノース	-
D-キシロース	-
D-グルコース	-
D-マンノース	-
D-フルクトース	-
D-ガラクトース	-
マルトース	-
シュクロース	-
ラクトース	-
トレハロース	-
D-ソルビトール	-
D-マンニトール	-
イノシトール	-
グリセリン	-
デンプン	-

- *1 試験用培地は酸生成用培地 (Gordon, R. E., Haynes, W. C. and Pang, C. H.: "The Genus Bacillus" (1973) U. S. Department of Agriculture) を使用した。
- *2 試験用培地はガス生成用培地 (Gordon, R. E., Haynes, W. C. and Pang, C. H.: "The Genus Bacillus" (1973) U. S. Department of Agriculture) を使用した。

表 5 化学分類学的性質

試験項目	試験結果
主要キノン系	MK-7

また、菌体内DNAのGC含量（HPLC法による）は46 mol%であった。

以上の形態観察、生理的性状試験および菌体内DNAのGC含量の測定の結果をもとに、Gordon, R.E., Haynes, W.C. and Pang, C.H.: "The Genus *Bacillus*" (1973) U.S. Department of Agriculture および Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E. and Holt, J.G.: "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology" Vol.2, (1986) Williams & Wilkins を参考にして同定した結果、上記の土壌細菌はバチルス・サブチルスに属する菌種であると同定された。この菌はバチルス・サブチルス・タケミと命名され、通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号）に平成10年12月1日付けで受託番号FERM BP-6589として寄託された。バチルスは耐熱性の胞子を形成するグラム陽性桿菌で、土壌等の一般環境に広く分布している。また、バチルス・サブチルスは枯草菌として知られている。バチルス・サブチルス・タケミは、上記の性質を有する他、上記方法で培養したシャーレーをそのまま約5℃に調節した冷蔵庫に保存したところ、顕著なコーヒー臭を発散していることが確認された。更に、バチルス・サブチルス・タケミは、細胞壁にキチンおよび／またはキトサンを含有することが確認されている。

バチルス・サブチルス・タケミの自然のおよび人工的変異体はもちろんのこと、硝酸塩を還元することができ、細胞壁にキチンおよび／またはキトサンを含む、バチルス属の微生物はすべて本発明に包含される。

本発明の微生物は土壌微生物として好ましい特性を有する。すなわち、硝酸塩を還元することができる。また、細胞壁に含有されているキチン質は、キトサン・キトサンオリゴ糖に低分子化される。有害微生物が代謝する毒素系とキトサン・キトサンオリゴ糖が反応して、DNAからRNAへ転写を阻害することによっ

て有害微生物の増殖を阻止し、植物の連作障害を改善する。また、本発明の微生物は、コーヒーの臭気によって密度が判明するので便利である。従って、本発明の微生物を用いて、土壌を改良することができる。

本発明の微生物の増殖に適した栄養素を含む水溶液に、本発明の微生物、所望により、土壌改良に有効な他の微生物を入れ、さらに、担体を入れて、攪拌する。この操作により、本発明の微生物が担体に担持される。この分散混合液を、上記の微生物の増殖に好適な温度（例えば、 $25 \sim 45^{\circ}\text{C}$ ）に保ち、微生物を育成・増殖させる。

本発明の微生物の増殖に適した栄養素としては、澱粉、デキストリン、グリセリン、グルコース、シュクロース、ガラクトース、トノシトール、マンニトールなどの炭素源、ペプトン、大豆粉、肉エキス、米糠、麴、尿素、コーンステイプリカー、アンモニウム塩、硝酸塩、その他の有機または無機の窒素化合物などの窒素源を挙げることができるが、これらに限定されることはない。その他、無機塩類、例えば、食塩、磷酸塩類、カリウム、カルシウム、亜鉛、マンガン、鉄などの金属塩類などを適宜添加してもよい。必要に応じて、消泡剤として、動物油、植物油、鉱物油などを添加してもよい。ポテトデキストロース寒天培地（商品名日水05707）などの培地を利用してもよい。土壌改良に有効な他の微生物としては、バチルス属、ラクトバチルス属などの加水分解酵素生産菌、サッカロミセス属、トルラ属などの酵母菌、アスペルギルス属、リゾブス属などの糸状菌などを挙げることができる。本発明の微生物を担持させる担体としては、多孔質のセラミックス、木片、木炭、ワラ片、その他本菌が生息しうる多孔性素材などを挙げることができる。担体1g当たりの本発明の微生物の菌数は、 $10^2 \sim 10^{10}$ 個が適当であり、好ましくは、 $10^3 \sim 10^6$ 個である。

本発明の微生物を担持させた担体あるいはそれを粉末にしたものは、単独でも、土壌改良材としての機能を持つが、通例は、有機肥料原料と混合してから発酵させ、肥料効果と土壌改良効果を合わせ持たせる。有機肥料原料1kg当たり、本発明の微生物を担持させた担体またはその粉末2～10gを混合するとよい。例えば、本発明の微生物を増殖させた多孔質セラミックスの粉末をバークや鶏糞その他の有機肥料原料と混合し、約30日発酵させる。そうすると、有機物の発

酵が進むと共に、土壤改良に有効な微生物を含んだ、しかも土壤改良材として有効なキチン・キトサンを豊富に含む、肥効性に富む土壤改良材が得られる。

上記の土壤改良材を土壤に投入するにあたっては、作土 10 a 当たりの本発明による微生物を含む土壤改良材を 150 Kg ~ 600 Kg、好ましくは 220 Kg ~ 520 Kg を投入するとよい。投入の時期は、農作物の生育初期から後期の収穫期のいずれの時期であってもよく、投入の頻度も特に限定されることはなく、土壤の状態、農作物の種類などに応じて、適宜選択すればよい。

本発明の微生物を用いて、有機性廃棄物を発酵処理することもできる。有機性廃棄物とは有機物からなる廃棄物をいい、これは、家庭廃棄物、産業廃棄物あるいは他のいかなる廃棄物であってもよい。また、畜糞、鶏糞及び食品汚泥なども含まれる。有機物の発酵分解には微生物が関与し、分解による悪臭、腐敗菌による悪臭が発生する。殊に、家庭から出る有機性廃棄物、畜糞、鶏糞及び食品汚泥における好気性菌の発酵において、酸素の供給のアンバランスで腐敗菌の増殖により生じる臭気は全国的に大きな社会問題になっている。本発明の微生物を用いて有機性廃棄物を発酵処理すれば、悪臭を防止することができるので大いに環境を改善する。また、本発明の微生物を用いて発酵処理した有機性廃棄物は、高品質な有機肥料として使用することができる。

本発明の微生物を通常の廃棄物処理用菌（主に好気性の桿菌類）と併用するとよい。

上記のように、本発明の微生物を担持させた担体（例えば、木片、多孔質セラミック玉や粒・顆粒など）を用意し、これを有機性廃棄物と混合して発酵処理させる。本発明の微生物を担持させた担体は、有機性廃棄物 1 kg 当たり 2 g ~ 10 g の量で使用するとよい。本発明の微生物と併用することのできる廃棄物処理用菌としては、廃棄物に含まれている糖分解の細菌や糸状菌、ヘミセルロースを分解する好気性の放線菌、セルロースを分解する嫌気性細菌、リグニンを分解する好気性担子菌などを挙げることができる。発酵処理にあたっては、有機性廃棄物 1 L に対して、毎分 100 ~ 200 mL の通気を行うとよい。また、通気の代わりに、攪拌により空気の供給を行ってもよい。温度は、周囲温度でもよいし、あるいは 12℃ ~ 51℃、好ましくは 25℃ ~ 45℃ に調整してもよい。水分調整

や通気性を改善するために、木質チップやもみがらなどの副資材を添加してもよい。発酵処理時間は、発酵処理物の組成により異なるが、通例1日～30日が適当であるが、好ましくは6日～20日である。発酵培地を投与することにより発酵を活発にすれば、有機性廃棄物の消滅処理も可能である。有機性廃棄物を資源と考え、バランスの取れた肥料として回収するためには、有機性廃棄物に家畜の糞や動物や魚の加工残さなども加えて組成の調整をするとよい。菌体に含まれるキチン・キトサンが処理物に含まれるので、発酵処理した有機性廃棄物は高品質の有機肥料となる。

バチルス・サブチルス・タケミの16S ribosomal RNA (16SrRNA) の相同性解析の結果、バチルス・サブチルス・ナットー(*Bacillus subtilis natto*)と約93%の相同性があることがわかった(第1図)。バチルス・サブチルス・ナットーは納豆の製造に使用されている。納豆は、凝固血液の溶解作用を有することが知られており、健康食として高く評価されている。また、バチルス・サブチルス・ナットーの代謝産物であるキチン・キトサン・キトサンオリゴ糖は、毒素系の微生物をセーブし、免疫力を高める重要な働きを持つことが知られている。しかし、バチルス・サブチルス・ナットーは硝酸塩の臭気を放つので、この臭いのために納豆を嫌う人が多い。また、硝酸塩の生成はタンパク質の劣化にもつながる。バチルス・サブチルス・タケミを始めとする本発明の微生物は硝酸塩の還元作用を持っているので、本発明の微生物を用いて大豆を発酵させれば、臭気の発生及びタンパク質の劣化が阻止される。また、従来の納豆はご飯などの副食として食されていたが、本発明の微生物を用いて製造した納豆はコーヒー臭があるので、パン、サンドイッチ、その他の西洋料理に大いに活用できる。その結果、栄養価が高く、健康維持のみならず健康の促進にも通じる機能性食品としての納豆を、日本人だけでなく世界中の人々に食してもらうことが可能となろう。

本発明の微生物を通常の納豆菌の代わりに使用して、納豆を作ることができる。すなわち、大豆を煮沸し、これに本発明の微生物を添加し、培養して繁殖させ、発酵作用を営ませた後、熟成させる。納豆の製造方法は、よく知られており、例えば、「改訂 食品加工技術ハンドブック」、p. 138-143、辻薦、建帛社、昭和46年発行に記載されている。

応用として、本発明の微生物で納豆を製造する際に、カテキンとイチョウの葉エキスを加える。ナトウキナーゼは凝固血液の溶解作用を有し血栓などの生成を防ぐ作用を有し、カテキンは抗菌性を持ちウイルスの増殖を抑える作用を有し、イチョウの葉エキスはSOD様の抗酸化物質で活性酸素の発生を阻止し毛細血管の血流を改善する作用を有する。本発明の微生物は硝酸塩還元菌なので、アンモニア臭などに由来するいわゆる納豆臭が軽微で、且つコーヒー臭でカムフラージュされるため、食べやすく、かつ、上記各種効能により、血管を丈夫にし、血管中のコレステロールのバランスを取る作用を付加することが出来るので、成人病や老人痴呆症予防ができる全く新規の納豆をつくることのできる。カテキン、イチョウの葉エキスなどは苦みを有しているが、本発明の微生物のまろやかな旨味が苦みを和らげ、さらに、コーヒー臭を発する菌が苦みといわゆる納豆特有の臭いをカムフラージュすると考えられる。

さらに、本発明の微生物は、飼料添加物として使用することもできる。本発明の微生物の添加の対象となる飼料は、畜産飼料、魚餌、家畜の餌、魚餌、その他ペット類の餌のいずれであってもよい。例えば、本発明の微生物を畜産飼料に添加すると、硝酸塩の還元酵素のはたらきにより家畜の生理障害が緩和される。また、家畜の飼料要求率が高まって、畜糞の排出タンパク質カロリーが低くなり、悪臭が改善される。

飼料1g当たり、菌数が $10^3 \sim 10^6$ 個程度になるように添加するとよい。

また、本発明の微生物は、食品、医薬品、化粧品などの苦味を低減化するために使用することもできる。苦味を有する食品としては、グレープフルーツ、レモン等の柑橘類及びその果汁；トマト、ピーマン、セロリ等の野菜、それを含む野菜汁及び野菜ジュース；納豆、豆乳などの大豆食品；魚肉、すり身などの水産加工食品肉類及び食肉加工品などを、苦味を有する医薬品としては、カテキン、イチョウ葉エキスなどを、苦味を有する化粧品としては、顔面に適用する化粧品、口腔に適用する化粧品などを挙げることができる。

本発明の微生物については、食品添加物としての各種の応用が考えられる。本明細書で、「食品」とは、すべての飲食品をいう。本発明の微生物の添加の対象となる食品は、特に限定されることはないが、畜肉、牛乳、魚介類およびその加

工品、並びに穀類、豆類、いも類、野菜類、果実類およびその加工品を含む。例えば、本発明の微生物をコーヒー臭のするアイスクリーム、コーヒー臭のするヨーグルトなどを作るための食品添加物として利用できる。本発明の微生物からなる食品添加物は、コーヒー臭はするが、カフェインが含まれないので習慣性が無いという長所を有する。食品 1 g 当たり、菌数が $10^3 \sim 10^5$ 個程度になるように添加するとよいが、この範囲は、食品の種類などにより変動しうる。

また、ラップやタッパなどの内面に本発明の微生物を塗布して使用すると、食品への有害性も無く、且つキチン・キトサンの抗菌性により腐敗、雑菌の繁殖を防ぎ、より長期の食品の保存が可能となる。ラップやタッパの 1 cm^2 当たりのキチン・キトサンの量は、菌数に換算して $10^1 \sim 10^5$ 個に相当する量を塗布するとよい。ラップやタッパなどの内面に本発明の微生物を塗布するには、本微生物の生菌あるいは死菌を純水に分散させ、超音波破碎し、その水分散液をラッピングシートやタッパなどに薄く塗布する。

ところで、アトピー性皮膚炎の患者の炎症部にはブドウ球菌が繁殖している。この患部に納豆菌を含むペーストを塗布すると、納豆菌がブドウ球菌を食べ、化膿の進行やアトピーの進行を抑える事が知られている。納豆菌の代わりに本発明の微生物を使用すると、従来の納豆菌の効果に加え、キチン・キトサンの効果で、ブドウ球菌の増殖が抑制されるため、アトピー治療効果が一層増進される。本発明の微生物を軟膏、ローション、クリーム、ペースト、ジェル、乳液、パックなどの剤型に製剤化することができる。製剤中の本発明の微生物の含有率は、特に限定されないが、 $0.0001 \sim 0.1$ 重量%とするとよい。本発明の微生物を含む製剤を $10^{-6} \sim 10^{-3} \text{ g}$ の量（活性成分である微生物の量に換算して）で、1日1～数回、アトピー性皮膚炎の患者の炎症部に適用するとよい。製剤を製造するにあたっては、構成成分として、スクワラン、パラフィン、ワセリンなどの炭水化物、オリーブ油、アーモンド油などの油脂、ミツロウ、ラノリンなどのロウ、ステアリン酸、オレイン酸などの脂肪酸、セタノール、ステアリルアルコールなどの高級アルコール、グリセリントリエステルなどの合成エステル、シリコン油などの油相成分、グリセリン、プロピレングリコール、ソルビット、ポリエチレングリコールなどの保湿剤、クインスシードガム、ペクチン、セルロース

誘導体などの粘液質、エタノール、イソロピルアルコールなどのアルコール、イオン交換水などの精製水、モノステアリン酸グリセリン、ソルビタン脂肪酸エステル、脂肪酸石けん、アルキル硫酸ナトリウムなどの界面活性剤、水酸化カリウム、水酸化ナトリウム、トリエタノールアミンなどのアルカリ、香料、色素、キレート剤、防腐剤、酸化防止剤、バッファー剤、ビタミン類、紫外線吸収剤、アミノ酸などを配合することができる。

図面の簡単な説明

第1図は、バチルス・サブチルス・タケミとバチルス・サブチルス・ナットーの16S rRNAの相同性解析の結果を示す。図中、並列している2つの列の上の列はバチルス・サブチルス・タケミの16S rRNAの1037-1406部位のヌクレオチド配列を示し、下の列はバチルス・サブチルス・ナットーの16S rRNAの相当部位のヌクレオチド配列を示す。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を実施例により具体的に説明する。本発明の範囲はこれらの実施例に限定されることはない。

〔実施例1〕

キチン・キトサンの定量

1. 検体

- 1) *Bacillus subtilis takemi*
- 2) *Bacillus subtilis nattoh*

2. 試験概要

検体について、下記のアルカリ処理により得られた不溶物を酸加水分解した後、高速液体クロマトグラフ法によりグルコサミンを定量し、キチン（又はキトサン）に換算した。

3. 試験結果

結果を表6に示す。

表 6 試験結果

検 体	キチン・キトサン (%)	
	キチン換算値	キトサン換算値
1)	0.044	0.035
2)	検出せず	検出せず
検出限界：0.001%		

4. 試験方法

1) アルカリ処理

検体約 5 g を精密に量りとり、8 W/V% 水酸化ナトリウム溶液 5 ml を加えて沸騰水浴中で 2 時間加熱した。室温になるまで冷却後、メンブランフィルター (0.45 μ m) で吸引ろ過し、ろ液が中性になるまで残留物を水洗した。

2) 酸加水分解

残留物をメンブランフィルターごと 60°C で 1 夜乾燥した後、封管用試験管に移した。これに 6 mol/l 塩酸 5 ml を加えて減圧封管し、100°C の乾燥器中で 16 時間加水分解した。室温になるまで冷却後、加水分解液をロータリーエバポレーターで濃縮乾固し、塩酸を除去した。残留物を少量の水に溶解後、水酸化ナトリウム溶液で中和し、水で全量を 10 ml とした。メンブランフィルター (0.45 μ m) でろ過した液を試験溶液とし、適宜希釈して高速液体クロマトグラフ法に供した。

3) グルコサミンの定量

高速液体クロマトグラフ (絶対検量線法、ピーク高さ測定) により試験溶液のグルコサミンを定量した。

4) 計算

- ① 測定されたグルコサミンをキチン (N-アセチルグルコサミンのポリマー) に換算した場合

$$\text{キチン (\%)} = G \times V / W \times 10^{-1} \times 1.1341$$

G : 検量線から求めた試験溶液のグルコサミン濃度 ($\mu\text{g/ml}$)

V : 試験溶液の定容量 (ml)

W : 検体採取量 (g)

1.1341 : グルコサミンからキチンへの重量換算係数

② 測定されたグルコサミンをキトサン (グルコサミンのポリマー) に換算した場合

$$\text{キトサン (\%)} = G \times V / W \times 10^{-4} \times 0.8995$$

G : 検量線から求めた試験溶液のグルコサミン濃度 ($\mu\text{g/ml}$)

V : 試験溶液の定容量 (ml)

W : 検体採取量 (g)

0.8995 : グルコサミンからキチンへの重量換算係数

〔実施例 2〕

土壌改良材の製造

陰・陽イオン 88 種を放出する粒状の無機多孔質のセラミックス (ゴールド興産株式会社商品: 商品名ゼットゴールド) を用意した。ブドウ糖 120 g、酵母エキス 60 g を含む水溶液 1,200 ml に当該無機多孔質セラミックス粒 3 Kg を加えよく攪拌した。この混合物に、バチルス・サブチルス・タケミ菌が 1×10^8 個/ml 含む液体 300 ml を加え攪拌した。この分散混合液を、25 ~ 45℃ に保ち、多孔質セラミックスの細孔内に菌を成育増殖させた。

これらのセラミックスを粉末にした後、ナタネ粕 200 Kg、骨粉 200 Kg、魚粕 150 Kg、米糠 150 Kg、大豆粉 100 Kg、鶏糞 100 kg、海藻堆肥 100 Kg からなる有機肥料原料と混合し、約 30 日発酵させた。その結果、有機物の発酵が進むと共に、土壌改良に有効な微生物を含んだ、しかも土壌改良材として有効なキチン・キトサンを豊富に含む、肥効性に富む土壌改良材が得られた。

〔実施例 3〕

本土壌改良材を使用したトマト栽培

トマトは連作を嫌う代表的な野菜である。連作障害は、農薬・化学肥料の多用により、根の根毛が焼けリンやミネラルの吸収ができなくなること、また、土壌有効微生物が死滅して有効微生物と植物との食物連鎖が阻害されること、有害微生物が繁殖して病気の原因となることなどが原因と言われる。

トマト栽培畑 10 a 当たり土壌改良材（実施例 2） 15 Kg 入りを 30～35 袋投与した。

そうすると、背丈の伸びは適度で、節間が短くがっしりと育ち、また、通例 3～4 段で花芽の成長が不順になる場合が多いが、そのような障害は認められず、一般の収穫よりも 20～30% 多い収穫ができた。さらに、通例連作 2 年目には病気の発生や収量の大幅な低下が見られる場合が多いが、本実施例の場合、4 年以上に渡り連作障害が認められず、良好な収量を確保できた。

トマトを引き抜いて見ると根が十分に張り、根毛が良く成長しているのが認められた。

〔実施例 4〕

有機性廃棄物を発酵処理するための発酵材の製造

陰・陽イオン 88 種を放出する粒状の無機多孔質のセラミックス（ゴールド興産株式会社商品：商品名ゼットゴールド）を用意した。ブドウ糖 120 g、酵母エキス 60 g を含む水溶液 1、200 ml に当該無機多孔質セラミックス粒 3 Kg を加えよく攪拌した。この混合物に、バチルス・サブチルス・タケミ菌を 1×10^8 個/ml 含む液体 300 ml を加え攪拌した。この分散混合液を、25～45℃に保ち、多孔質セラミックスの細孔内に菌を成育増殖させた。

〔実施例 5〕

有機性廃棄物の発酵処理

縦型生ゴミ発酵装置（ゴールド興産株式会社商品：商品名タケミ式生ゴミ発酵装置 6 型）を使用して、有機性廃棄物を発酵処理した。

本処理装置は、縦型で、内径 600 ミリ、高さ 600 ミリの発酵槽が 3 段に積み重ねられている。最上段は生ゴミ投入口、2～3 段は発酵槽である。一日当た

り 50 ～ 100 Kg の生ゴミが連続して処理できる。各段の槽は独立して回転できるようにしており、且つ各段には攪拌と生ゴミの破碎を兼ねた回転刃が取り付け有る。各槽は独立して空気の吸排気ができるようになっており、また、発酵槽は断熱材で覆われ、温度コントロールが独立してできるようになっている。

一段目の槽には、実施例 4 で製造した発酵材を予め投入しておいた。発酵材の投入量は概ね 50 Kg であり、摩耗等で若干減耗するが、1 年から 5 年間は補充なしで連続使用可能である。上部投入口から業務用あるいは家庭から出た生ゴミを投入し、槽を回転させながら空気を送り、35 ～ 45℃ に加温することで、発酵材中の発酵菌が成育し、生ゴミの発酵が開始した。生ゴミに家畜の糞や動物や魚の加工残さなども加えて組成の調整をした。

時間の経過と共に、生ゴミは、2 段目、3 段目と移動しながら発酵が進み、最後に 3 段目の下部から、良質の肥料として取り出された。

バチルス・サブチルス・タケミは硝酸塩還元菌なのでアンモニアに起因する異臭を発生せず、且つコーヒー臭を発するので異臭の発生がない。また、排出物はキチン・キトサンを含有する良質の土壌改良材を兼ねた肥料となる。

〔実施例 6〕

大豆（1 kg）を洗って、十分な量の水に半日浸した。十分に吸水した大豆を、大豆が親指と人指し指で簡単に押しつぶせる様になるまで、蒸した。

蒸し上がった大豆に、大さじ 2 杯のお湯に溶いた耳かき 2 杯のバチルス・サブチルス・タケミ菌をかけた。大豆が熱いうちに、均等に全体に行き渡るように手早くかけた。

大豆を、空気に接することができるように、浅く（2 cm 位の高さで）容器に盛った。

この容器を 42℃ 前後に調節された恒温室に入れ 1 ～ 2 日保温すると、大豆の表面に白い膜が見え、納豆が出来上がった。冷蔵庫に入れて冷やすと、更に熟成して美味しくなった。

出来上がった納豆は、菌触りは従来品と同等であるが、バチルス・サブチルス・タケミ菌は硝酸塩還元菌なので、納豆特有のアンモニア臭が無く、かつ菌特有

のコーヒー臭がする。この結果、納豆が嫌いな人も食べやすい、またご飯以外の副食としても適する食品となっていた。

〔実施例 7〕

飼料添加物の製造

成分

ヒューマス	3 0 %
酵母エキス	1 8 %
ゼットゴールド	1 5 %
天然抗菌材料 (ヒノキチオール, ブラジル純正プロポリス)	1 0 %
天然有機酸 (リンゴ酸, 酢酸, クエン酸, コウジ酸混合液)	7 %
乳化オリゴ糖	5 %
天然ビタミン C 類	5 %
有用菌* 分散液 (総数 1.0×10^8 個/L)	1 0 %

* : エンテロコッカスフェジウム、ラクトバチルスアシドフィルス、ビフィドバクテリウムビフィダム

製造法

P-17ゼットゴールド（主成分が天然カルシウムのセラミックス、ゴールド興産株式会社商品）は多孔質のセラミックスであり、実施例 4 と同様の処理をし、バチルス・サブチルス・タケミ菌を培養させた。これを家畜が食するのに支障のない 1 mm 以下の粉末に粉碎した。この粉末に上記他の成分を所定の割合で混合攪拌し、35～45℃に保ち発酵させた。このとき、飼料 1 g 当たり菌数が $1.0 \times 10^3 \sim 1.0 \times 10^6$ 個になるように発酵条件を調整した。

〔実施例 8〕

飼料添加物の給餌

実施例 7 で製造した飼料添加物を、下記の比率で家畜の餌に添加給餌した。

牛－0.4%、豚－0.6%、鶏－0.3～0.4%

同一養豚場でほぼ同時に生まれた子豚の一群から、健康に生まれた豚 15 頭と虚弱に生まれた豚 15 頭を抽出した。75 日齢から本飼料添加物を 0.6% 添加し給餌開始した。

75 日齢で虚弱群は平均体重で 3 Kg 低かった。175 日齢で試験区と対照区の体重差が無くなった。出荷時の 200 日齢で、虚弱グループの試験区は平均体重で対照区より 2.8 Kg 多くなった。

試験区の豚の内臓は黄疸症状が無く心臓肥大も無かった。脂肪の融点が 3.2℃ 高く、活性酸素の原因となる不飽和脂肪酸の少ない良質の脂肪となっていた。糞便の異臭発生も軽減された。

〔実施例 9〕

1 Kg の乾燥大豆を蒸し、蒸し上がった大豆に、カテキン（15 g～30 g、株式会社伊藤園製）とイチョウの葉エキス（15 g～30 g、タマ生化学株式会社製）を添加し、以下実施例 6 と同じ方法で納豆を製造した。

その結果、市販の納豆にカテキンとイチョウの葉エキスを添加したものと比較して、実施例 6 で製造した納豆にカテキンとイチョウの葉エキスを添加したものは、納豆臭が激減したばかりでなく、カテキンとイチョウの葉エキスの苦味も低減した。

〔実施例 10〕

下記の処方で、バチルス・サブチルス・タケミ菌を含有する製剤を作製した。

クリーム

バチルス・サブチルス・タケミ菌	10 ⁹ ～ 10 ¹² 個
ステアリルアルコール	6.0 g
ステアリン酸	2.0 g
水添ラノリン	4.0 g
スクワラン	9.0 g
オクチルドデカノール	10.0 g

1,3 ブチレングリコール	6. 0 g
PEG 1500	4. 0 g
POE(25) セチルアルコールエーテル	3. 0 g
モノステアリン酸グリセリン	2. 0 g
精製水*	54. 0 g

* : ミネラル《88》（ゴールド興産株式会社製）で製造した、陰・陽ミネラルイオン88種含有液

〔実施例11〕

牛乳1000mlにヨーグルトの素15ml、さらに、実施例4で調製した平均粒径1～10 μ m無機多孔質セラミックスにバチルス・サブチルス・タケミ菌を増殖させたもの1gを添加し、よくかき混ぜた。温度を約30℃に保ち3～6時間保温すると、ヨーグルトができあがった。

このようにして作ったヨーグルトは、バチルス・サブチルス・タケミ菌の効果で酸っぱさが和らぎ、キチン・キトサンオリゴ糖が含まれ栄養価が高まり、且つコーヒーの香りのする健康によく食べやすいヨーグルトであった。

〔実施例12〕

バチルス・サブチルス・タケミ菌を含有する増殖液を遠心分離器にかけ、上澄みを捨てた。沈降物に純水を加え再分散洗浄し、再度遠心分離器にかけた。これを5回繰り返す、最終遠心沈降物を取り出した。この沈降物を純水に分散させた。この時、菌数が $1 \times 10^9 \sim 1 \times 10^{11}$ /mlになるようにした。

この分散液を超音波破碎機にかけ、菌を微粉碎した。このようにして作成した菌微粉碎液を霧吹き機にいれ、塩化ビニールなどからなるラッピングシートに吹き付け塗布し、十分乾燥させ巻き取った。分散液1mlで1m²塗布した。なお、この一連の操作は、雑菌の入らない無菌室で実施した。

このようにして作成したラッピングシートと市販の開封直後のラッピングシートに、大腸菌が 10^6 個/ml含まれる培養液を0.1ml滴下し、30℃で8

時間放置した。その結果、市販品は大腸菌の増殖が進み、コロニーの生成が認められたが、本菌を塗布したラッピングシートはコロニーの生成は認められず、抗菌性があることが確認できた。

なお、微粉碎バチルス・サブチルス・タケミ菌分散液として、抗菌性のチタンイオン、銀イオン、ゲルマニウムイオン、コバルトイオン、ネオジウムイオン等を含有するイオン水を使用すると、抗菌性は一層強化される。

本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

産業上の利用可能性

本発明の微生物は、土壌の改良、有機性廃棄物の発酵処理、大豆の発酵、苦味の低減化のために使用することができるので、有用である。また、本発明の微生物は、飼料添加物、食品添加物としても使用することができる。さらに、本発明の微生物は抗菌作用も有する。

請 求 の 範 囲

1. 硝酸塩を還元することができ、細胞壁にキチンおよび／またはキトサンを含むことを特徴とする、バチルス属の微生物。
2. さらに、コーヒー臭のあることを特徴とする請求項1記載の微生物。
3. バチルス・サブチルス (*Bacillus subtilis*)に属する請求項1または2記載の微生物。
4. バチルス・サブチルス・タケミ (*Bacillus subtilis takemi*: FERM B P - 6 5 8 9)である請求項3記載の微生物。
5. 請求項1記載の微生物を用いて、土壌を改良する方法。
6. 請求項1記載の微生物を含む、土壌を改良するための組成物。
7. 請求項1記載の微生物を用いて、有機性廃棄物を発酵処理する方法。
8. 請求項1記載の微生物を含む、有機性廃棄物を発酵処理するための組成物。
9. 請求項1記載の微生物を用いて、大豆を発酵させる方法。
10. 請求項1記載の微生物を用いて発酵させた大豆。
11. 請求項1記載の微生物を飼料添加物として使用する方法。
12. 請求項1記載の微生物を含む飼料添加物。
13. 請求項1記載の微生物を苦味の低減化のために使用する方法。
14. 請求項1記載の微生物を含む、苦味の低減化のための組成物。
15. 請求項1記載の微生物を食品添加物として使用する方法。
16. 請求項1記載の微生物を含む食品添加物。
17. 請求項1記載の微生物を用いて、細菌の増殖を抑制する方法。
18. 請求項1記載の微生物を含む抗菌性組成物。

第 1 図

[GENETYX-MAC : Nucleotide Sequence Homology Data]

1st Nucleotide Sequence

File Name : coffee 16S rRNA (E.coli 16SrRNAの1037-1406部位)
Sequence Size : 326

2nd Nucleotide Sequence

File Name : Bacillus subtilis (Accession No.D84213)
Sequence Size : 15467

Unit Size to Compare = 4

Pick up Location = 1

[92.7% / 331 bp] OPT.Score : < 1117 >

1' GAGATGTT-GGTAAAGTCCCGCGACGAG-GCNACCCTTG-TNTNAGTNGCCAGCAATTCAG-

1700' GAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGC-ATTCAGT

59' TNGGCANTNTAAAGTGACTGCC-GTGACAAGCCGGAGGAAAGGTGGGAATGACGTCAAATCA
..*.*.*
1761' TGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGG-AAGGTGGGGATGACGTCAAATCA

120' TCATGCCCCCTATACGACNTGGGCTACACACGTGCTACCATGGACAGAACAAGGGCAGCGAA

1822' TCATGCCCCCT-TATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAGGGCAGCGAA

182' ACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTNTGCAACTTCG

1883' ACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAAC-TCG

244' ACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCG

1944' ACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCG

305' GGCCTTGTACACACCGCCCGT

2006' GGCCTTGTACACACCGCCCGT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/00117

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁶ C12N1/20, C05F11/08, A23L1/20, A23K1/16, A23L1/015, A23L3/3571

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁶ C12N1/20, C05F11/08, A23L1/20, A23K1/16, A23L1/015, A23L3/3571

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI (DIALOG), BIOSIS PREVIEWS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, 63-304990, A (Meiji Seika Kaisha, Ltd.), 13 December, 1988 (13. 12. 88) (Family: none)	1-18
A	JP, 7-155193, A (Toyobo Co., Ltd.), 20 June, 1995 (20. 06. 95) (Family: none)	1-18
A	JP, 3-228689, A (Asahi Chemical Industry Co., Ltd.), 9 November, 1991 (09. 11. 91) (Family: none)	1-18
A	JP, 3-236771, A (Meiji Seika Kaisha, Ltd.), 13 February, 1990 (13. 02. 90) (Family: none)	1-18

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 29 March, 1999 (29. 03. 99)	Date of mailing of the international search report 6 April, 1999 (06. 04. 99)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁶ C12N 1/20, C05F 11/08, A23L 1/20, A23K 1/16, A23L 1/015, A23L 3/3571

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁶ C12N 1/20, C05F 11/08, A23L 1/20, A23K 1/16, A23L 1/015, A23L 3/3571

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG)

BIOSIS PREVIEWS (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP, 63-304990, A (明治製菓株式会社) 13. 12月. 1988 (13. 12. 88) ファミリーなし	1-18
A	JP, 7-155193, A (東洋紡績株式会社) 20. 6月. 1995 (20. 06. 95) ファミリーなし	1-18
A	JP, 3-228689, A (旭化成工業株式会社) 9. 11月. 1991 (09. 11. 91) ファミリーなし	1-18
A	JP, 3-236771, A (明治製菓株式会社) 13. 2月. 1990 (13. 02. 90) ファミリーなし	1-18

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

29.03.99

国際調査報告の発送日

06.04.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

新見 浩一

4 B

9 1 6 2

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

PRODUCTION OF CHITOSAN OLIGOSACCHARIDE DERIVED FROM MICROORGANISM

Patent Number: JP7155193
Publication date: 1995-06-20
Inventor(s): SHIBATANI SHIGEO; others: 02
Applicant(s):: TOYOBO CO LTD
Requested Patent: ☐ JP7155193
Application Number: JP19930306581 19931207
Priority Number(s):
IPC Classification: C12P19/26
EC Classification:
Equivalents:

Abstract

PURPOSE:To efficiently produce a chitosan oligosaccharide derived from a microorganism, especially the chitosan oligosaccharide having a high degree of polymerization of pentamer or a high polymer from a hypha of a microorganism capable of producing chitosan according to a simplified process.
CONSTITUTION:The characteristic of this method for producing a chitosan oligosaccharide derived from a microorganism comprises treating a hyphal cell wall of a microorganism capable of producing chitosan such as *Absidia coerulea* IFO5301 strain or *Mucor tuberculisporus* IFO9256 strain with an enzyme capable of producing the chitosan oligosaccharide such as Chitosanase RD<(>R<)> derived from *Bacillus* sp. PI-7S or Cellulase onozuka R-10<(>R<)> derived from *Trichoderma viride*.

Data supplied from the esp@cenet database - I2



(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-155193

(43) 公開日 平成7年(1995)6月20日

(51) Int. CL ⁶	識別記号	庁内整理番号	P I	技術表示箇所
C 1 2 P 19/26		7432-4B		
# (C 1 2 P 19/26				
C 1 2 R 1:07)				

審査請求 未請求 請求項の数 5 O L (全 4 頁)

(21) 出願番号	特願平5-306581	(71) 出願人	000003160 東洋紡績株式会社 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目2番8号
(22) 出願日	平成5年(1993)12月7日	(72) 発明者	柴谷 滋郎 滋賀県大津市堅田二丁目1番1号 東洋紡 績株式会社総合研究所内
		(72) 発明者	宮下 正人 滋賀県大津市堅田二丁目1番1号 東洋紡 績株式会社総合研究所内
		(72) 発明者	前川 宣彦 滋賀県大津市堅田二丁目1番1号 東洋紡 績株式会社総合研究所内

(54) 【発明の名称】 微生物由来キトサンオリゴ糖の製造方法

(57) 【要約】

【目的】 キトサン産生微生物の菌糸体から簡略化された工程で微生物由来のキトサンオリゴ糖、特に5量体以上の高重合度のキトサンオリゴ糖を効率的に製造する。

【構成】 アブシディア・コエルレア (*Abisidia coerulea*) IF05301 株またはムコル・ツベルクリスポルス (*Mucor tuberculisporus*) IF09256 株などのキトサン産生微生物の菌糸体細胞壁を、バチルス (*Bacillus*) sp. PI-75 由来キトサナーゼ-RD またはトリコデルマ・ヴィリデ (*Trichoderma viride*) 由来セルラーゼ・オノズカ R-10 等のキトサンオリゴ糖を生成する酵素で処理することを特徴とする微生物由来キトサンオリゴ糖の製造方法。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 キトサン産生微生物の菌糸体細胞壁を分解し、キトサンオリゴ糖を生成する酵素により、キトサン産生微生物の菌糸体を処理することを特徴とする微生物由来キトサンオリゴ糖の製造方法。

【請求項2】 キトサン産生微生物がアブシディア・コエルレア(*Absidia coerulea*)またはムコル・ツベルクリスボルス(*Mucor tuberculisporus*)であることを特徴とする請求項1記載の微生物由来キトサンオリゴ糖の製造方法。

【請求項3】 キトサン産生微生物の菌糸体細胞壁を分解し、キトサンオリゴ糖を生成する酵素が、キトサナーゼまたはセルラーゼであることを特徴とする請求項1記載の微生物由来キトサンオリゴ糖の製造方法。

【請求項4】 キトサナーゼがバチルス属由来キトサナーゼであることを特徴とする請求項1記載の微生物由来キトサンオリゴ糖の製造方法。

【請求項5】 セルラーゼがトリコデルマ属由来セルラーゼであることを特徴とする請求項1記載の微生物由来キトサンオリゴ糖の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明はキトサンオリゴ糖の製造方法に関し、詳しくはキトサン産生微生物の菌糸体を酵素処理することによるキトサンオリゴ糖の製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 近年、キトサンは、地球上に豊富に存在する次世代のバイオマスとして注目されており、その生体適合性や生分解性を活かした種々の用途開発が研究されている。キトサンは高分子量であるが故に溶液とした場合、高粘度のために取扱いが困難であり、高濃度の溶液の調製が不可能である。また、溶液を中性ないしアルカリ性にするとう溶化する。これらの特性がキトサンの用途を制限している。そこで、キトサンの用途を広げるものとして、高分子量のキトサンを加水分解して得られる易水溶性のキトサンオリゴ糖の利用が期待されている。特に5量体以上の高重合度のキトサンオリゴ糖に抗菌性、抗腫瘍性、植物エリシター活性等の種々の生理活性が見出されており、付加価値が高まっている。

【0003】 従来からキトサンオリゴ糖の製造法として、カニやエビ等の甲殻類から抽出したキチンを化学的に脱アセチル化することにより得られるキトサンを塩酸等の酸によって加水分解して低分子化する方法(J. Am. Chem. Soc., 79, 5046~5049, (1957))が知られている。しかしながら、この方法は酸を用いることによる安全性の問題や後処理の煩雑さに難点がある。また甲殻類から得られたキトサンをキトサナーゼ等のキトサン分解酵素で加水分解する方法が報告されている(特公平3-13878号公報)が、この方法では生理活性が期待される5

量体以上の高重合度のキトサンオリゴ糖が高収率で得られていない。

【0004】 一方、微生物の中には接合菌類のように菌糸体細胞壁中にキトサンを含むものがあることが報告されている(Ann. Rev. Microbiol., 22, 87-108, (1968))。微生物由来のキトサンオリゴ糖の製造法として、キトサン産生微生物の菌糸体をアルカリで加熱処理した後に酢酸等の酸で抽出したキトサンを酵素によって加水分解して低分子化する方法が報告されている(特開平2-215393号公報)。しかしながら、微生物から抽出したキトサンを用いる場合、単位培養液当たりのキトサン生産量が低いために甲殻類から製造したキトサンを用いる場合に比較して価格が非常に高くなるという欠点がある。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】 本発明の目的は、キトサン産生微生物の菌糸体から簡略化された工程で微生物由来のキトサンオリゴ糖、特に5量体以上の高重合度のキトサンオリゴ糖を効率的に製造する方法を提供することにある。

【0006】

【課題を解決するための手段】 本発明者らは、キトサナーゼ等の細胞壁溶解酵素が微生物の細胞壁を分解することに着目し、キトサン産生微生物の菌糸体を酵素処理することにより高重合度のキトサンオリゴ糖を製造し得ることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0007】 すなわち、本発明はキトサン産生微生物の菌糸体細胞壁を分解し、キトサンオリゴ糖を生成する酵素により、キトサン産生微生物の菌糸体を処理することを中心とするキトサンオリゴ糖の製造方法である。

【0008】 本発明に用いられる微生物としては、キトサンを産生しうる微生物であればいずれも用いることができる。例えばアブシディア(*Absidia*)属、アクチノムコル(*Actinomucor*)属、コアネフォラ(*Choanephora*)属、クニングハメラ(*Cunninghamella*)属、モルティエラ(*Mortierella*)属、ムコル(*Mucor*)属、フィコマイセス(*Phycomyces*)属、リゾプス(*Rhizopus*)属等の接合菌類が挙げられる。具体例としては、アブシディア・コエルレア(*Absidia coerulea*) IF05301株、ムコル・ツベルクリスボルス(*Mucor tuberculisporus*) IF09256株などが例示される。これらの微生物は、財団法人発酵研究所(IFO)から入手することができる。

【0009】 本発明に使用する酵素は、上記キトサン産生微生物の菌糸体細胞壁を分解し、キトサンオリゴ糖を生成する酵素であればいずれも用いることができる。例えば、バチルス(*Bacillus*)属、ストレプトマイセス(*Streptomyces*)属、ペニシリウム(*Penicillium*)属等に由来するキトサナーゼ、アスペルギルス(*Aspergillus*)属、トリコデルマ(*Trichoderma*)属等に由来するセルラーゼが挙げられる。さらに具体的にはバチルス(*Bacillus*) sp. PI-75由来キトサナーゼ(RX(ビラス製))、トリコデル



マ・ヴィリデ(*Trichoderma viride*)由来セルラーゼ・オノズカR-10(ヤクルト製)が挙げられる。これらの酵素はまず、例えば0.1M酢酸緩衝液(pH5.5)に約0.1~50U/ml添加し酵素製剤とする。酵素製剤のpHは、4.0~7.0であることが好ましい。

【0010】酵素活性は以下の方法により測定する。pH 6.0の酢酸緩衝液に溶解した1%キトサン溶液と酵素液を含む反応液を37℃で10分間反応させる。反応液を約100℃で5分間加熱処理して酵素処理を終了した後、シャーレス(Schaes)変法(Agric. Biol. Chem., 35, 1154-1156(1971))によりキトサナーゼ活性を測定する。1単位は、pH6.0、37℃において1分間に可溶性キトサンから1μモルのグルコサミン相当の還元糖を遊離する酵素量である。

【0011】工程1：菌糸体の調製

本発明に用いるキトサン産生微生物の菌糸体は、斜面培地等で継代培養した微生物をキトサン生産用液体培地で培養し、増殖することにより得られる。キトサン生産用液体培地としては、例えば酵母エキス0.1~2.5%、ポリペプトン0.5~5%、グルコース1~10%、硫酸アンモニウム0.5~1%、リン酸2水素カリウム0.1~1%、塩化ナトリウム0.1~1%、硫酸マグネシウム(7水和物)0.05~0.1%および塩化カルシウム(2水和物)0.01~0.1%を含むpH4.5の液体培地が例示される。培養条件としては、キトサン生産用液体培地で約25℃にて振とう培養する。培養期間は、4~5日間が好ましい。孢子濃度は $10^6 \sim 10^7$ 個/mlが好ましい。

工程2：菌糸体の破碎

培養された菌糸体は、例えば酢酸緩衝液等の水溶液中に浸漬してホモジナイザー等によって破碎した後、酵素処理に供する。

工程3：酵素処理

例えば酢酸緩衝液等の水溶液中に、上記酵素を添加した酵素製剤中に破碎した菌糸体を浸漬して振とうし、例えば、30~60℃にて1時間以上の酵素処理を行うことにより、反応液中にキトサンオリゴ糖を生成する。酵素処理は穏やかに振とうして行う。

工程4：反応終了

一般に約100℃で約5分間加熱処理して酵素処理を終了する。

工程5：精製

生成されたキトサンオリゴ糖は、イオンクロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィー等を用いることにより重合度別に分離することができる。

【0012】

【実施例】以下に実施例を挙げて本発明を詳細に説明する。

実施例1

ポテト・デキストロース寒天(日水製薬製)斜面培地上で25℃にて継代培養したアブシディア・コエルレア(*Absidia* 50

coerulea) IF05301株の孢子を滅菌水に懸濁した。孢子懸濁液を酵母エキス0.1%、ポリペプトン1%、グルコース2%、硫酸アンモニウム0.5%、リン酸2水素カリウム0.1%、塩化ナトリウム0.1%、硫酸マグネシウム(7水和物)0.05%および塩化カルシウム(2水和物)0.01%を含むpH4.5の液体培地100mlに、 $10^6 \sim 10^7$ 個/mlの孢子濃度となるように接種し、回転速度120rpm、25℃にて攪拌し、4日間培養した。生長した菌糸体を吸引直して集め、洗浄後、酵素処理に供した。

【0013】得られた菌糸体4gを0.1M酢酸緩衝液(pH5.5)に浸漬し、ホモジナイザーで破碎した。緩衝液を除去した後、破碎した菌糸体を、0.1M酢酸緩衝液(pH5.5)に0.1U/mlの濃度で添加したバチルス(*Bacillus*) sp. PI-75由来キトサナーゼ-RD(ピアス製)の酵素製剤120ml中に浸漬し、37℃にて1時間以上穏やかに振とうして菌糸体の酵素処理を行った。酵素処理後、反応液を100℃で5分間加熱処理して反応を停止させた後、薄層クロマトグラフィー(TLC)により、酵素処理反応液中の酵素分解物を分析した。シリカゲルのTLCプレート(メルク社製Kieselgel 60F)に酵素処理反応液およびカニ殻由来キトサン分解物標準溶液を塗布し、1-ブタノール-酢酸-水=2:1:2で展開し、ニンヒドリン溶液で発色し、スポットの検出を行った。その結果、カニ殻由来キトサンオリゴ糖のスポットと一致するスポットが酵素処理反応液に認められた。図1はその結果を示す。

【0014】次に、全反応液のTLCを行い、キトサンオリゴ糖6量体に相当する画分の薄層を回収した。回収した薄層画分を0.1M酢酸中に懸濁し、不溶物を濾過して除去した後、溶出液を凍結乾燥することにより、6量体を主成分とする高重合度キトサンオリゴ糖画分118mqが得られた。

【0015】実施例2

実施例1と同様に、ムコル・ツベルクリスポルス(*Mucor tuberculisporus*) IF09256株を培養して得られた菌糸体4gを、0.1M酢酸緩衝液(pH5.5)に0.1U/mlの濃度で添加したトリコデルマ・ヴィリデ(*Trichoderma viride*)由来セルラーゼ・オノズカR-10(ヤクルト製)の酵素製剤120ml中で処理した。以後、実施例1と同様の操作を行った結果、酵素処理反応液のTLCにカニ殻由来キトサンオリゴ糖のスポットと一致するスポットが認められた。次に、全反応液のTLCを行った結果、高重合度キトサンオリゴ糖画分39mqが得られた。

【0016】比較例1

実施例1と同様の方法でアブシディア・コエルレア(*Absidia coerulea*) IF05301株を培養し、得られた菌糸体4gに2%水酸化ナトリウム水溶液300mlを加えて、オートクレーブ中で121℃にて1時間加熱処理した。得られたアルカリ不溶物質をガラスフィルターで集め、精製水で洗液が中性になるまで洗浄した。このアルカリ不溶物質710mqを2%酢酸水溶液300mlに浸漬し、ホモジナイザーで



破碎した後、37℃にて30分間攪拌した。攪拌後、遠心分離して、上澄液と沈殿に分離した。沈殿2回分の上澄液をガラスフィルターで濾過して不溶物を除去した。この酢酸抽出液に20%水酸化ナトリウム水溶液を添加して抽出液をpH8.5～9.0に調整し、キトサンを析出させた。析出したキトサンの水洗と遠心分離を計3回行った後、真空乾燥した。菌糸体から得られたキトサンの総量は204mgであった。上記方法で得られたアブシディア・コエルレア IF05301 株由来のキトサン204mgを0.1M酢酸緩衝液に溶解して調製した1%キトサン溶液(pH5.5)に0.1U/mlのバチルスsp.PI-75由来のキトサナーゼを加えて、37℃にて酵素反応を1時間以上行った。反応液を100℃で5分間加熱処理して反応を停止させた後、実施例1と同様の操作でTLCを行った。その結果、カニ殻由来キトサンオリゴ糖のスポットと一致するスポットが酵素反応*

液に認められた。次に全反応液のTLCを行った結果、6量体を主成分とする高重合度キトサンオリゴ糖画分41mgが得られた。

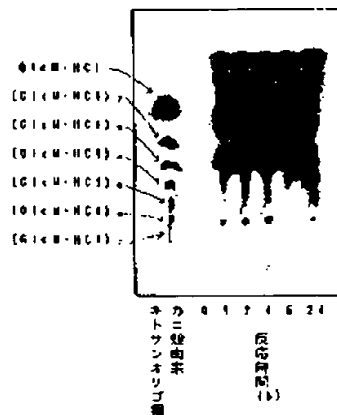
【0017】

【発明の効果】本発明によれば、キトサン産生微生物の菌糸体を酵素処理することにより、高重合度のキトサンオリゴ糖を得ることができる。本発明は、従来のキトサンオリゴ糖の製造法のようにキトサンを抽出することなく、より簡略化された工程でキトサンオリゴ糖を得ることができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】アブシディア・コエルレア IF05301 株の菌糸体をバチルスsp.PI-75由来キトサナーゼで酵素処理して得られた反応液をTLCで分析した結果を示す。

【図1】



EUROPEAN PATENT OFFICE

①

Patent Abstracts of Japan

PUBLICATION NUMBER : 03047263
PUBLICATION DATE : 28-02-91

APPLICATION DATE : 14-07-89
APPLICATION NUMBER : 01180469

APPLICANT : DAINICHISEIKA COLOR & CHEM MFG CO LTD;

INVENTOR : HORIGUCHI SHOJIRO;

INT.CL. : A61L 27/00 C08B 37/08

TITLE : ARTIFICIAL HAIR

ABSTRACT : PURPOSE: To obtain an artificial hair with a natural gloss, a touch and a feeling which are extremely similar to those of a human hair and freely dyeable after making a wig therewith by preparing the title artificial hair of a fiber made of chitosan as a main component.

→ CONSTITUTION: The title artificial hair is prepd. of chitosan or polyvinyl alcohol(PVA) and chitosan as main components thereof. Chitosan is a polymer consisting of D-glycosamine prepd. by deacetylation of chitin based on a well known method and N-acetyl-D-glycosamine. Chitin as the raw material in this case is not especially restricted and can be usually obtd. from a cuticle of an arthropod such as a crab and a shrimp, an insect, a bacillus, etc., by means of a well known method. It is thereby possible to obtain an artificial hair with a natural gloss, a touch and a feeling which are extremely similar to those of a human hair and in addition, freely dyeable after making a wig therewith.

COPYRIGHT: (C)1991,JPO&Japio

<p>2000-159465/14 B04 D16 VLAN= 1997.07.23 VOLG ANTI-PLAGUE RES INST *RU 2122026-C1 1997.07.23 1997-113006(+1997RU-113006) (1998.11.20) C12N 1/20, A61K 35/74 (C12N 1/20, C12R 1:125) Strain of bacillus subtilis, tpac, showing resistance to tetracycline, rifampicin, ampicillin, streptomycin and exhibiting antibacterial activity with respect to microorganism pathogenic species C2000-049736 Addnl. Data: BULANTSEV A L, TIKHONOV N G, LIPNITSKII A V</p> <p>NOVELTY - Strain B. subtilis TPAC-KM-116 shows inhibiting activity with respect to pathogenic species of microorganisms B. anthracis (anthracis pathogen), V. cholerae (different types of cholera pathogen), Y. pestis (plague pathogen), Ps. pseudomallei (melioidosis pathogen). Strain shows also multiple (Rifr, Apr, Strr, Tc) drug resistance. Strain ensures to construct on its basis high-active antibiotic-resistant probiotic that can be used for treatment and prophylaxis of patients with infectious diseases at simultaneous therapy with antibiotics.</p> <p><u>USE</u> Microbiology.</p>	<p>B(4-F10B1) D(5-H4) .1</p> <p><u>ADVANTAGE</u> New strain indicated above, enhanced effectiveness of the strain. 2 tbl, 2 exr (9999DwgNo.0/0)</p>
	RU 2122026-C



P.B.5818 - Patentlaan 2
2280 HV Rijswijk (ZH)
☎ +31 70 340 2040
TX 31651 epo nl
FAX +31 70 340 3016

**Europäisches
Patentamt**

Zweigstelle
in Den Haag
Recherchen-
abteilung

**European
Patent Office**

Branch at
The Hague
Search
division

**Office européen
des brevets**

Département à
La Haye
Division de la
recherche

Denison, Christopher Marcus
Mewburn Ellis
York House
23 Kingsway
London WC2B 6HP
GRANDE BRETAGNE

RECEIVED

- 2 APR 2003

RECORDED	✓
RECORDED	
DIARY LIST	
REVALUED	
ALREADY	

Datum/Date

02.04.03

Zeichen/Ref./Ref	Anmeldung Nr./Application No./Demande n°/Patent Nr./Patent No./Brevet n°
CMD/FP5943147	99900326.2-2405-JP9900117
Anmelder/Applicant/Demandeur/Patentinhaber/Proprietor/Titulaire	
Gold Kosan Co. Ltd, et al	

COMMUNICATION

The European Patent Office herewith transmits as an enclosure the European search report for the above-mentioned European patent application.

If applicable, copies of the documents cited in the European search report are attached.

☒ Additional set(s) of copies of the documents cited in the European search report is (are) enclosed as well.

REFUND OF THE SEARCH FEE

If applicable under Article 10 Rules relating to fees, a separate communication from the Receiving Section on the refund of the search fee will be sent later.





European Patent
Office

SUPPLEMENTARY
EUROPEAN SEARCH REPORT

Application Number
EP 99 90 0326

DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			
Category	Citation of document with indication, where appropriate, of relevant passages	Relevant to claim	CLASSIFICATION OF THE APPLICATION (Int.Cl.7)
X	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 015, no. 189 (C-0831), 15 May 1991 (1991-05-15) (1) & JP 03 047263 A (DAINICHISEIKA COLOR & CHEM MFG CO LTD), 28 February 1991 (1991-02-28) * abstract *	1-3	C12N1/20 C05F11/08 A23L1/20 A23K1/16 A23L1/015 A23L3/3571 A23K1/00 A23L1/03 A23L1/211 C12R1/125
X	BASHAN Y.: "Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture." (2) BIOTECHNOL. ADV., vol. 16, no. 4, 1998, pages 729-770, XP004123985 * the whole document *	5,6	
X	US 5 531 898 A (WICKHAM DANIEL E) (3) 2 July 1996 (1996-07-02) * the whole document *	7,8	
X	WO 96 39840 A (O DONNELL FAMILY TRUST) (4) 19 December 1996 (1996-12-19) * the whole document *	7,8	TECHNICAL FIELDS SEARCHED (Int.Cl.7)
X	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 1997, no. 05, (5) 30 May 1997 (1997-05-30) & JP 09 009903 A (FUJITSUKO KK), 14 January 1997 (1997-01-14) * abstract *	9,10	A23K A23C A23L C05F C12R
X	EP 0 287 699 A (CALPIS FOOD IND CO LTD) (6) 26 October 1988 (1988-10-26) * the whole document *	11,12	
--- -/-- The supplementary search report has been based on the last set of claims valid and available at the start of the search.			
Place of search MUNICH		Date of completion of the search 26 March 2003	Examiner Armandola, E
CATEGORY OF CITED DOCUMENTS X : particularly relevant if taken alone Y : particularly relevant if combined with another document of the same category A : technological background O : non-written disclosure P : intermediate document T : theory or principle underlying the invention E : earlier patent document, but published on, or after the filing date D : document cited in the application L : document cited for other reasons & : member of the same patent family, corresponding document			

2

EPO FORM 1503 03 82 (P04C04)



European Patent
Office

SUPPLEMENTARY
EUROPEAN SEARCH REPORT

Application Number
EP 99 90 0326

DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT							
Category	Citation of document with indication, where appropriate, of relevant passages	Relevant to claim	CLASSIFICATION OF THE APPLICATION (Int.Cl.7)				
X	RU 2 122 026 C (VOLG NI SKIJ PROTIVOCHU;MNYJ INST) 20 November 1998 (1998-11-20) * the whole document *	17,18					
X	WO 98 50422 A (MANKER DENISE CAROL ;AGRAQUEST INC (US); MCCOY RANDY JAY (US); HEI) 12 November 1998 (1998-11-12) * the whole document *	17,18					
A	HOFFMANN T ET AL: "THE ANAEROBIC LIFE OF BACILLUS SUBTILIS: CLONING OF THE GENES ENCODING THE RESPIRATORY NITRATE REDUCTASE SYSTEM" FEMS MICROBIOLOGY LETTERS, AMSTERDAM, NL, vol. 131, no. 2, 1995, pages 219-225, XP001030899 ISSN: 0378-1097						
			TECHNICAL FIELDS SEARCHED (Int.Cl.7)				
The supplementary search report has been based on the last set of claims valid and available at the start of the search.							
Place of search MUNICH		Date of completion of the search 26 March 2003	Examiner Armandola, E				
<table border="0"><tr><td>CATEGORY OF CITED DOCUMENTS</td><td>T : theory or principle underlying the invention E : earlier patent document, but published on, or after the filing date D : document cited in the application L : document cited for other reasons & : member of the same patent family, corresponding document</td></tr><tr><td>X : particularly relevant if taken alone Y : particularly relevant if combined with another document of the same category A : technological background O : non-written disclosure P : intermediate document</td><td></td></tr></table>				CATEGORY OF CITED DOCUMENTS	T : theory or principle underlying the invention E : earlier patent document, but published on, or after the filing date D : document cited in the application L : document cited for other reasons & : member of the same patent family, corresponding document	X : particularly relevant if taken alone Y : particularly relevant if combined with another document of the same category A : technological background O : non-written disclosure P : intermediate document	
CATEGORY OF CITED DOCUMENTS	T : theory or principle underlying the invention E : earlier patent document, but published on, or after the filing date D : document cited in the application L : document cited for other reasons & : member of the same patent family, corresponding document						
X : particularly relevant if taken alone Y : particularly relevant if combined with another document of the same category A : technological background O : non-written disclosure P : intermediate document							

2

EPO FORM 1503 03 82 (P04C04)

**ANNEX TO THE EUROPEAN SEARCH REPORT
ON EUROPEAN PATENT APPLICATION NO.**

EP 99 90 0326

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned European search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

26-03-2003

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
JP 03047263	A	28-02-1991	JP	2579216 B2	05-02-1997
US 5531898	A	02-07-1996	WO	9631439 A1	10-10-1996
WO 9639840	A	19-12-1996	US	5702701 A	30-12-1997
			WO	9639840 A2	19-12-1996
JP 09009903	A	14-01-1997	NONE		
EP 0287699	A	26-10-1988	JP	1709946 C	11-11-1992
			JP	3079988 B	20-12-1991
			JP	63209580 A	31-08-1988
			CA	1318623 A1	01-06-1993
			DE	3786784 D1	02-09-1993
			DE	3786784 T2	03-03-1994
			DK	66688 A	26-08-1988
			EP	0287699 A2	26-10-1988
			ES	2005248 A6	01-03-1989
			US	4919936 A	24-04-1990
			US	RE34837 E	24-01-1995
RU 2122026	C	20-11-1998	RU	2122026 C1	20-11-1998
WO 9850422	A	12-11-1998	AU	732724 B2	26-04-2001
			AU	7476798 A	27-11-1998
			BG	103855 A	30-06-2000
			BR	9809282 A	27-06-2000
			CN	1255143 T	31-05-2000
			EP	0981540 A1	01-03-2000
			HU	0004555 A2	28-06-2001
			JP	2001507237 T	05-06-2001
			NO	995462 A	06-01-2000
			NZ	500506 A	25-05-2001
			PL	336716 A1	03-07-2000
			SK	149099 A3	14-08-2000
			TR	9902765 T2	21-07-2000
			US	6060051 A	09-05-2000
			WO	9850422 A1	12-11-1998
			US	6103228 A	15-08-2000
			US	6291426 B1	18-09-2001
			US	6417163 B1	09-07-2002

PCT COOPERATION TREATY

HIRAKI Yusuke
PCT Rec'd 13 JUL 2001
JUL 31 2000
RECEIVED

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

HIRAKI, Yusuke
Toranomon No.5 Mori Building
Third Floor
17-1, Toranomon 1-chome
Minato-ku
Tokyo 105-0001
JAPONNOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE
COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL
APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

Date of mailing (day/month/year) 20 July 2000 (20.07.00)		
Applicant's or agent's file reference PH-593-PCT		IMPORTANT NOTICE
International application No. PCT/JP99/00117	International filing date (day/month/year) 14 January 1999 (14.01.99)	
Priority date (day/month/year)		
Applicant GOLD KOSAN CO. LTD. et al		

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this Notice:

AU,CN,JP,KR,US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present Notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:

AL,AM,AP,AT,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,CA,CH,CU,CZ,DE,DK,EA,EE,EP,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,
HU,ID,IL,IN,IS,KE,KG,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MD,MG,MK,MN,MW,MX,NO,NZ,OA,PL,PT,RO,
RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,UA,UG,UZ,VN,YU,ZW

The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).

3. Enclosed with this Notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on 20 July 2000 (20.07.00) under No. WO 00/42169

REMINDER REGARDING CHAPTER II (Article 31(2)(a) and Rule 54.2)

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a demand for international preliminary examination must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))

If the applicant wishes to proceed with the international application in the national phase, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer J. Zahra Telephone No. (41-22) 338.83.38
--	---

13T
Translation

ATENT COOPERATION TREA

PCT

JUL 2001

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference PH-593-PCT	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP99/00117	International filing date (day/month/year) 14 January 1999 (14.01.1999)	Priority date (day/month/year)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 1/20, C05F 11/08, A23L 1/20, A23K 1/16, A23L 1/05, A23L 3/3571		
Applicant GOLD KOSAN CO. LTD.		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 3 sheets, including this cover sheet.

☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of _____ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 28 May 1999 (28.05.1999)	Date of completion of this report 14 January 2000 (14.01.2000)
Name and mailing address of the IPEA/JP Japanese Patent Office, 4-3 Kasumigaseki 3-chome Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan Facsimile No.	Authorized officer Telephone No. (81-3) 3581 1101

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/00117

I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application:*

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the claims:
pages _____, as originally filed
pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the drawings:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/00117

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-18	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-18	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-18	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

The inventions disclosed in claims 1-18 are neither disclosed in any of the documents cited in the ISR or any other documents considered to bear relation to said inventions, nor is it considered that they could have easily been invented by a person skilled in the art by combining the disclosures in said documents.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/00117

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁶ C12N1/20, C05F11/08, A23L1/20, A23K1/16, A23L1/015, A23L3/3571

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁶ C12N1/20, C05F11/08, A23L1/20, A23K1/16, A23L1/015, A23L3/3571

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI (DIALOG), BIOSIS PREVIEWS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, 63-304990, A (Meiji Seika Kaisha, Ltd.), 13 December, 1988 (13. 12. 88) (Family: none)	1-18
A	JP, 7-155193, A (Toyobo Co., Ltd.), 20 June, 1995 (20. 06. 95) (Family: none)	1-18
A	JP, 3-228689, A (Asahi Chemical Industry Co., Ltd.), 9 November, 1991 (09. 11. 91) (Family: none)	1-18
A	JP, 3-236771, A (Meiji Seika Kaisha, Ltd.), 13 February, 1990 (13. 02. 90) (Family: none)	1-18



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T"

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
29 March, 1999 (29. 03. 99)Date of mailing of the international search report
6 April, 1999 (06. 04. 99)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL FORM

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF
MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF
PATENT PROCEDURE

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT

issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page.

TO DEPOSITOR:

Name: GOLD KOSAN CO. LTD.

Representative: Takemi AONUMA

Address: 251, Aza-Higashida, Sumozone, Furukawa-shi, Miyagi

1. IDENTIFICATION OF MICROORGANISM	
Identification Reference Given by the Depositor: Bacillus subtilis takemi	Accession Number: FERM BP-6589
2. A SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC POSITION	
<p>The microorganism identified under 1 above was accompanied by a document stating the following item(s).</p> <p><input type="checkbox"/> A Scientific Property</p> <p><input type="checkbox"/> Taxonomic Position</p>	
3. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
<p>This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under 1 above, which was received on December 1, 1998. (date of the original deposit)</p>	
4. RECEIPT OF REQUEST FOR TRANSFER	
<p>This International Depositary Authority received the microorganism under 1 above on _____ (date of the original deposit), and received on _____ a request for transfer from the original deposit to the deposit under the Budapest treaty.</p>	
5. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
<p>Name: National Institute of Bioscience and Human-Technology Agency of Industrial Science and Technology</p> <p>Representative: <u>Shinichi OHASHI</u> (sealed) Dr. ,DIRECTOR GENERAL.</p> <p>Address: 1-3, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566, JAPAN</p> <p style="text-align: right;">Date: December 1, 1998</p>	



特許手続上の微生物の寄託の国際的承認
に関するブダペスト条約

下記国際寄託当局によって規則7.1に従い
発行される。

原寄託についての受託証

氏名(名称)

ゴールド興産株式会社

代表取締役 青沼 武三

寄託者

あ て 名 所

宮城県古川市李塚字東田251

殿

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF
MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF
PATENT PROCEDURE

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL
DEPOSIT

issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this
page.

1. 微生物の表示

(寄託者が付した識別のための表示)

Bacillus subtilis takemi

(受託番号)

FERM BP- 6589

2. 科学的性質及び分類学上の位置

1欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。

- 科学的性質
- 分類学上の位置

3. 受領及び受託

本国際寄託当局は、平成10年12月1日(原寄託日)に受領した1欄の微生物を受託する。

4. 移管請求の受領

本国際寄託当局は、
年 月 日(原寄託日)に1欄の微生物を受領した。
そして、
年 月 日に原寄託よりブダペスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。

5. 国際寄託当局

通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所

名称: National Institute of Advanced Industrial Science and Technology
Agency of Industrial Science and Technology

所長 大箸 信一

Dr. Shinichi Oshikiri Director-General

あて名: 日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号(郵便番号305-8566)

1-3, Higashi 1 chome Tsukuba-shi Ibaraki-ken
305-8566, JAPAN

平成10年(1998)12月1日

17
T

特 許 協 力 条 約

P C T

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)
〔PCT36条及びPCT規則70〕

REC'D 21 JAN 2000

WIPO

PCT

WIPO

PCT

出願人又は代理人 の書類記号 PH-593-PCT	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知（様式PCT/IPEA/416）を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP99/00117	国際出願日 (日.月.年) 14.01.99	優先日 (日.月.年)
国際特許分類 (IPC) Int.Cl ⁷ C12N 1/20, C05F 11/08, A23L 1/20, A23K 1/16, A23L 1/015, A23L 3/3571		
出願人 (氏名又は名称) ゴールド興産株式会社		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条 (PCT36条) の規定に従い送付する。
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で <u>3</u> ページからなる。 <input type="checkbox"/> この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。 (PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照) この附属書類は、全部で _____ ページである。
3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。 I <input checked="" type="checkbox"/> 国際予備審査報告の基礎 II <input type="checkbox"/> 優先権 III <input type="checkbox"/> 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成 IV <input type="checkbox"/> 発明の単一性の欠如 V <input checked="" type="checkbox"/> PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明 VI <input type="checkbox"/> ある種の引用文献 VII <input type="checkbox"/> 国際出願の不備 VIII <input type="checkbox"/> 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 28.05.99	国際予備審査報告を作成した日 14.01.00	
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 新見 浩一	4N 9162
電話番号 03-3581-1101		内線 3488

様式PCT/IPEA/409 (表紙) (1998年7月)

I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT 14条)の規定に基づく命令に
 応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。
 PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- ☐ 明細書 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
 明細書 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 明細書 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 請求の範囲 第 _____ 項、 出願時に提出されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 PCT 19条の規定に基づき補正されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 図面 第 _____ ページ/図、 出願時に提出されたもの
 図面 第 _____ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 図面 第 _____ ページ/図、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性(N)	請求の範囲	1-18	有
	請求の範囲		無
進歩性(IS)	請求の範囲	1-18	有
	請求の範囲		無
産業上の利用可能性(IA)	請求の範囲	1-18	有
	請求の範囲		無

2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

請求の範囲1-18に記載された発明は国際調査報告に表示された文献及び当該発明に関連があると認められる文献に記載されておらず、かつ、それらの文献の記載を組み合わせることにより当業者にとって容易に発明できたものでもない。

137
Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference PH-593-PCT	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP99/00117	International filing date (<i>day month year</i>) 14 January 1999 (14.01.1999)	Priority date (<i>day month year</i>)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 1/20, C05F 11/08, A23L 1/20, A23K 1/16, A23L 1/05, A23L 3/3571		
Applicant GOLD KOSAN CO. LTD.		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>3</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of _____ sheets.</p>
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p>

Date of submission of the demand 28 May 1999 (28.05.1999)	Date of completion of this report 14 January 2000 (14.01.2000)
Name and mailing address of the IPEA/JP Japanese Patent Office, 4-3 Kasumigaseki 3-chome Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan Facsimile No.	Authorized officer Telephone No. (81-3) 3581 1101

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/00117

I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application:*

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the claims:
pages _____, as originally filed
pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the drawings:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/00117

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-18	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-18	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-18	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

The inventions disclosed in claims 1-18 are neither disclosed in any of the documents cited in the ISR or any other documents considered to bear relation to said inventions, nor is it considered that they could have easily been invented by a person skilled in the art by combining the disclosures in said documents.



P C T

国際調査報告

(法 8 条、法施行規則第 40、41 条)
[P C T 1 8 条、P C T 規則 43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 PH-593-PCT	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220) 及び下記 5 を参照すること。	
国際出願番号 PCT/J P 99/00117	国際出願日 (日.月.年) 14.01.99	優先日 (日.月.年)
出願人 (氏名又は名称) ゴールド興産株式会社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第 41 条 (P C T 1 8 条) の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 2 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない (第 I 欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している (第 II 欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第 III 欄に示されているように、法施行規則第 47 条 (P C T 規則 38.2(b)) の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から 1 カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 _____ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁶ C12N 1/20, C05F 11/08, A23L 1/20, A23K 1/16, A23L 1/015, A23L 3/3571

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁶ C12N 1/20, C05F 11/08, A23L 1/20, A23K 1/16, A23L 1/015, A23L 3/3571

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG)

BIOSIS PREVIEWS (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP, 63-304990, A (明治製菓株式会社) 13. 12月. 1988 (13. 12. 88) ファミリーなし	1-18
A	JP, 7-155193, A (東洋紡績株式会社) 20. 6月. 1995 (20. 06. 95) ファミリーなし	1-18
A	JP, 3-228689, A (旭化成工業株式会社) 9. 11月. 1991 (09. 11. 91) ファミリーなし	1-18
A	JP, 3-236771, A (明治製菓株式会社) 13. 2月. 1990 (13. 02. 90) ファミリーなし	1-18

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

29.03.99

国際調査報告の発送日

06.04.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

新見 浩一



4B

9162

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

(54) PRODUCTION OF HIGHLY PURIFIED MALTOSE

- (11) 3-228688 (A) (43) 9.10.1991 (19) JP
 (21) Appl. No. 2-22031 (22) 2.2.1990
 (71) TOWA KASEI KOGYO K.K. (72) MASAHIRO NIIMI(5)
 (51) Int. Cl⁵. C12P19/20,C07H3/02,C12P19/22

PURPOSE: To readily obtain the subject purified maltose in high purity and a low cost by crystallizing an aqueous solution of maltose containing respectively fixed amount of monosaccharide, maltose and oligosaccharide of at least trisaccharide with controlling crystallizing condition.

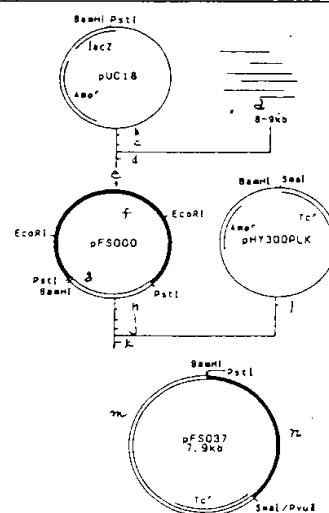
CONSTITUTION: Corn starch, etc., is liquefied, saccharified and purified to obtain (A) an aqueous solution of maltose containing 1-40 wt.% monosaccharide, 60-91wt.% maltose and 1-8wt.% oligosaccharide of at least trisaccharide respectively in solid component and having 65-84wt.% concentration. Then, the component A is adjusted to have 47-70wt.% saturated concentration of maltose, thus crystallized under the condition at 20-65°C crystallization initiating temperature for 24-96hr total time of the crystallizing operation and at 0-50°C final temperature in cooling to obtain a crystal mass kit (B). Next, the component B is filtered and adjusted to contain 55-70wt.% solid part in the filtered solution after separation of crystal and 8-75 pts.wt. the filtered solution to 100 pts.wt. solution before crystallization to produce highly purified maltose.

(54) PRODUCTION OF CYTIDINE BY FERMENTATION

- (11) 3-228689 (A) (43) 9.10.1991 (19) JP
 (21) Appl. No. 2-25574 (22) 5.2.1990
 (71) ASAHI CHEM IND CO LTD (72) KAORU FURUYA
 (51) Int. Cl⁵. C12P19/38//C12N1/21,C12N15/32(C12P19/38,C12R1/07)

PURPOSE: To enable mass-production of cytidine by transforming a specific microorganism with a recombinant DNA containing a cytidine triphosphate synthetase(CTP synthetase) gene and culturing the transformant.

CONSTITUTION: *Bacillus natto* C-1 strain (A) capable of producing cytidine and having the following bacteriological properties is separated from soil. The shape and size of the cell, bacillus, (0.7-1.0)×(2-8)μm; Gram-positive; reducing nitric acid salt; hydrolyzing starch; etc. The cell of the strain A is extracted and cloned to obtain a CTP synthetase gene (B). The component B is introduced into a vector and the strain A is transformed with the resultant recombinant DNA (C) (e.g. plasmid pFS037) to obtain a recombinant (D). Cytidine is produced by inoculating the strain D on a medium containing glucose, tetracycline, etc., and culturing at about 37°C for about 3 days.



a: chromosome of *Bacillus natto* C-1 digested with PstI.
 b: digestion with PstI. c: alkaline phosphatase. d: T4 ligase. e: selection in *E. coli* JF618. f: originated from chromosome of *Bacillus natto* C-1. g: originated from pUC18. h: digestion with BamHI and PvuII. i: agarose gel electrophoresis. j: recovery of 3.0kb fragment. k: T4 ligase. l: digestion with BamHI and SmaI. m: originated from pHY300PLK. n: originated from chromosome of *Bacillus natto* C-1

(54) MONOCLONAL ANTIBODY AGAINST BLOOD COAGULATION FACTOR XIII

- (11) 3-228690 (A) (43) 9.10.1991 (19) JP
 (21) Appl. No. 2-24007 (22) 2.2.1990
 (71) DAI ICHI PURE CHEM CO LTD (72) TAKASHI MATSUMOTO(3)
 (51) Int. Cl⁵. C12P21/08,C12N5/20,G01N33/53,G01N33/577//C12N15/06(C12P21/08,C12R1/91)

PURPOSE: To enable quick, easy and accurate determination of the subject factor by culturing a specific hybridoma.

CONSTITUTION: Subunit (a) of blood coagulation factor XIII (A) is prepared by fractionating and purifying human plasma, etc. An antibody-producing cell (B) is produced by immunizing mouse BALB/c with the component A and separating the spleen cell from the mouse. The cell B is mixed with mouse myeloma cell (C) such as SP2/OAg14 at a ratio of 1:(10-1×10⁷-*), subjected to cell fusion in the presence of polyethylene glycol and screened and cloned to obtain a hybridoma (D) capable of producing monoclonal antibody. The objective monoclonal antibody (E) against the component A is produced by culturing the strain D and purifying the cultured product by ammonium sulfate fractionation, ion exchange chromatography, etc. The antibody E optionally labeled with an enzyme such as peroxidase and the antibody E adsorbed to a microplate are made to react with desired antigen and the blood coagulation factor XIII is determined by enzyme immunoassay.

